

Rekombinante bovin-humane Parainfluenzaviren Typ 3 als Impfvektoren gegen nicht-virale Antigene

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biochem. Henrick Schomacker

geboren am 1.12.1977 in Lüneburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter:	1.	Prof. Dr. Detlev Krüger
	2.	PD Dr. Thorsten Wolff
	3.	Prof. Dr. Alexander Schmidt

eingereicht: 7. November 2007

Datum der Promotion: 25. April 2008

Meinen Eltern

*... dieses unbeschreibliche Gefühl,
dass das Eis trägt.*

Inhaltsverzeichnis

WIDMUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ZUSAMMENFASSUNG	X
SUMMARY	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Impfstoffentwicklung	1
1.2 Viren	2
1.3 Die Ordnung <i>Mononegavirales</i>	3
1.4 Humane Parainfluenzaviren	5
1.5 Rekombinante Viren	8
1.6 Die bovin-humane Chimäre des Parainfluenzavirus Typ 3 (bhPIV3)	11
1.7 Das bhPIV3 als Vektor gegen virale Antigene	12
1.8 EGFP	13
1.9 Die Baumwollratte als Versuchstier	14
1.10 Das <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
2 AUFGABENSTELLUNG	21
3 MATERIAL	22
3.1 Bakterien	22
3.2 Zellen	22

3.3	Viren	23
3.4	Plasmide und Nukleinsäuren	23
3.5	Verbrauchsmaterialien	23
3.6	Antikörper	24
3.7	Puffer und Lösungen	26
3.8	Enzyme und Reagenzien	27
3.9	Kommerziell erworbene Kits und Assays	27
3.10	Medien	27
3.11	Geräte	28
3.12	Computerprogramme	28
4	METHODEN	29
4.1	Molekularbiologische Methoden	29
4.2	Proteinbiochemische Methoden	38
4.3	Zellbiologische und virologische Methoden	41
4.4	Tierexperimentelle Methoden	47
4.5	Bestimmung der viralen Replikation	51
4.6	Bestimmung neutralisierender Antikörper	51
5	ERGEBNISSE	54
5.1	Transfer und Aufbau des rekombinanten Genetiksystems	54
5.2	Herstellung neuer rekombinanter Viren	56
5.3	Überprüfung der hergestellten rekombinanten Viren	60
5.4	Replikation rekombinanter bhPIV3 in der Baumwollratte	63
5.5	Protektiver Effekt der bhPIV3-Vektoren	65
5.6	Charakterisierung und Anwendung des bhPIV3-EGFP	73

6	DISKUSSION	79
6.1	Herstellung, Überprüfung und Quantifizierung der rekombinanten Viren	80
6.2	Die Maus als Tiermodell für bhPIV3-Immunisierungen	82
6.3	Impferfolg der rekombinanten viralen Vektoren gegen Tuberkulose im Mausmodell	83
6.4	Die Baumwollratte als Tiermodell für bhPIV3-Infektionen	83
6.5	Das bhPIV3-EGFP und seine Anwendung im FRNT	88
	LITERATURVERZEICHNIS	90
	ANHANG	100
	VERÖFFENTLICHUNG	104
	LEBENS LAUF	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
	DANKSAGUNG	105
	ERKLÄRUNG	106

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCG	<i>Bacille Calmette Guérin</i>
bhPIV3	Bovin-humane Chimäre des Parainfluenzavirus 3
bp	Basenpaare
BSL	Biologische Sicherheitsstufe (<i>biosafety level</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGFP	Verstärkt (<i>enhanced</i>) grün-fluoreszierendes Protein
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtstreulicht (<i>Forward scatter</i>)
H37Rv	Bezeichnung des wichtigsten infektiösen <i>M. tb.</i> -Referenzstamms
hMPV	Humanes Metapneumovirus
hPIV1-4	Humanes Parainfluenzavirus Typ 1 bis 4
hRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
M	Molar (mol / l)

<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPI	Max-Planck-Institut
MPI-IB	MPI für Infektionsbiologie, Berlin
<i>M. tb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA	Modifiziertes Vakziniavirus, Stamm Ankakra
NIH	<i>National Institutes of Health, USA</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	Plaque bildende Einheit (<i>plaque forming units</i>)
p.i.	nach der Infektion (<i>post infectionem</i>)
rcf	Zentrifugalkraft relativ zur Erdanziehungskraft (<i>relative centrifugal force</i>)
RD1	<i>region of difference 1</i> , im BCG-Genom deletierte Region
RNA	Ribonukleinsäure
SARS-CoV	SARS-Coronavirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtstreulicht (<i>Sideward scatter</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose 50%</i>
TH ₁	Typ 1 T-Helferzelle

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Zusammenfassung

Bei bhPIV3 handelt es sich um ein bovines Parainfluenzavirus Typ 3 (bPIV3), dessen Oberflächenproteingene gegen jene des humanen Parainfluenzavirus Typ 3 (hPIV3) ausgetauscht wurden. Dieses ursprünglich als experimenteller Impfstoff gegen hPIV3 entwickelte Virus wurde darüber hinaus als Impfvektor zur Expression anderer viraler Antigene verwendet. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurden die ersten bhPIV3-basierten Vektoren für nicht-virale Antigene hergestellt und in einem ersten Versuch evaluiert. Dazu wurden ein reverses Genetiksystm zur Herstellung rekombinanter bhPIV3 in einem neuen Labor aufgebaut und fünf neue rekombinante Viren erhalten, welche zusätzlich Antigene des *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) exprimieren.

Balb/c-Mäuse wurden intranasal mit den bhPIV3-Vektoren infiziert, so dass sowohl deren Replikation als auch der induzierte protektive Effekt gegenüber *M. tb.*-Neuinfektionen getestet werden konnte. In einem ersten Versuch zeigte sich, dass eine Immunisierung mit den rekombinanten Viren allein keine Schutzwirkung entfaltet. Als *Boost*-Impfung nach Gabe des *Bacille Calmette Guérin* (BCG) zeigten einige Vektoren jedoch einen signifikanten protektiven Effekt. In einem Folgeversuch konnten diese Beobachtungen jedoch bislang nicht bestätigt werden, so dass weitere Versuche durchzuführen sind, bevor eine endgültige Aussage bezüglich des hervorgerufenen Schutzeffektes getroffen werden kann.

In einem weiteren Tierversuch wurde gezeigt, dass die Baumwollratte ein Tiermodell darstellt, in dem bhPIV3 erheblich schlechter repliziert als hPIV3. Trotz der eingeschränkten Replikation induzierte bhPIV3 neutralisierende Antikörpertiter gegen hPIV3, die mit durch hPIV3 induzierten Titern vergleichbar waren. Mit Hilfe eines neu generierten rekombinanten Virus, welches das grün fluoreszierende Protein EGFP exprimiert, konnte ein Weg aufgewiesen werden, die Bestimmung neutralisierender Antikörpertiter deutlich zu vereinfachen.

Schlagworte: rekombinante Parainfluenzaviren, Mykobakterien, Immunisierung, EGFP

Summary

The initial objective of this project was to establish a reverse genetic system for generation of recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (bhPIV3), a bovine PIV3 (bPIV3) in which the bhPIV3 glycoprotein genes are replaced by their counterparts of human PIV3 (hPIV3). In addition, methods needed to characterise virus infectivity, genetic integrity and relevant in vitro phenotypes were established. The reverse genetics system was used to add individual mycobacterium tuberculosis (*M. tb.*) open reading frames (ORFs) as supernumerary gene units to the bhPIV3 genome and to rescue bhPIV3 vectors that expressed *M. tb.* antigens. In addition, a similar vector expressing the *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) was constructed.

Following the in vitro characterization of the derived viral vectors, the *M. tb.* vectors were evaluated for their efficacy to protect against *M. tb.* aerosole challenge in the Balb/c mouse model for tuberculosis. Although, in a single experiment, vaccination with bhPIV3 vectors alone did not confer any protection against *M. tb.* challenge, a boost with selected bhPIV3 vectors after *Bacille Calmette Guérin* (BCG) priming was successful in conferring protective efficacy against *M. tb.* challenge. A repeat of this challenge study could not confirm the initial observation, and further experiments are needed to determine whether the observed protection can be reliably reproduced.

Evaluation of the bhPIV3 vectors in the cotton rat model showed that this small animal model is suitable to evaluate the attenuation phenotype of bhPIV3 compared to human parainfluenza virus type 3 (hPIV3). Although replication of bhPIV3 was highly restricted compared to hPIV3, hPIV3 neutralizing antibody titers induced by bhPIV3 infection were similar to those induced by hPIV3 infection. Studies with bhPIV3 expressing EGFP led to a new fluorescence based assay to determine hPIV3 neutralizing antibody titers. This assay could save time and resources in hPIV3 serology.

Keywords: recombinant parainfluenza viruses, mycobacteria, immunization, EGFP

1 Einleitung

1.1 Impfstoffentwicklung

Infektionskrankheiten begleiten die Geschichte der Menschheit seit Jahrtausenden, doch erst in den letzten Jahrhunderten wurde deren Ursprung verstanden und wurden präventive und therapeutische Strategien entwickelt. Dabei spielt die aktive Immunisierung gefährdeter Individuen mit Hilfe von Impfstoffen eine herausragende Rolle.

Bereits im elften Jahrhundert wurde in Südostasien Material aus Pockennarben auf gesunde Individuen übertragen, eine Technik, die im Grundprinzip der modernen Impfung gleicht. Das Wissen über diese später Variolation genannte Prozedur erreichte spätestens 1721 England, wo sie weite Verbreitung fand [1,2].

Ende des 18. Jahrhunderts beobachtete Edward Jenner, dass eine Infektion mit Kuhpocken, einem für Menschen weitgehend harmlosen Erreger, vor einer schweren Pockeninfektion zu schützen schien. Im Jahr 1798 schließlich berichtete Jenner von der Immunisierung eines Jungen gegen Pocken durch intradermale Applikation von Kuhpocken (Skarifizierung), und dokumentierte damit den ersten medizinischen Impfversuch Europas. Der Ansatz, artfremde Erreger zur Immunisierung gegen gefährliche humanpathogene Krankheiten zu verwenden, wird auch heute noch als „Jennerscher Ansatz“ bezeichnet und auch das für Immunisierungen gebräuchliche Wort Vakzination (*vacca*: lat. Kuh) stammt aus diesem ursprünglichen Zusammenhang.

Weitere Impfstoffe (siehe Tabelle 1.1) wurden erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts entwickelt und eingesetzt [3]. Diese reduzierten, unterstützt durch verbesserte sozioökonomische Bedingungen und die Anwendung der sich entwickelnden Hygieneregeln, die Inzidenz und Prävalenz von Infektionskrankheiten erheblich. Heute stehen gegen viele der ehemals bedrohlichsten Krankheitserreger sichere Impfstoffe zur Verfügung, und im Fall der Pocken, des ersten mit Impfstoff bekämpften Erregers, ist sogar die Ausrottung des Erregers gelungen [3].

Tabelle 1.1: Impfstoffentwicklung bis 1940

Übersicht der ersten mit Impfstoffen bekämpften Krankheiten: Die ersten Impfstoffe bestanden aus abgeschwächten oder abgetöteten Erregern. Erst später wurden gereinigte Bestandteile der Erreger verwendet (verändert nach [3]).

Abgeschwächte Lebendimpfstoffe	Abgetötete vollständige Organismen	Gereinigtes Toxoid
18. Jahrhundert		
Pocken (Jenner, 1798)		
19. Jahrhundert		
Tollwut (1885)	Typhus (1896)	
	Cholera (1896)	
	Pest (1897)	
20. Jahrhundert		
Tuberkulose (1927)	Keuchhusten (1926)	Diphtherie (1923)
Gelbfieber (1935)	Grippe (1936)	Wundstarrkrampf (1927)

1.2 Viren

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten ohne eigenen Energiestoffwechsel. Das bedeutet, dass sie nach klassischer Definition keine Lebewesen darstellen, sondern eher als Produkt genetischer Programme zu verstehen sind, die für ihre eigene Vermehrung kodieren. Für eben diese Vermehrung bedürfen Viren lebender Organismen, die das genetisch kodierte virale Programm umsetzen. Dieser Prozess setzt wiederum voraus, dass das Virusgenom in eine Wirtszelle gelangt, wo die Transkription der genetischen Information in mRNAs und die Translation in Proteine stattfinden können.

Aufgrund dieser gemeinsamen Prinzipien teilen alle Viren bestimmte Eigenschaften: Das Virion, wie ein viraler Partikel auch genannt wird, enthält ein Genom, das entweder aus DNA oder RNA (oder aus beiden) besteht und durch Proteine in einer Nukleokapsid genannten Struktur vor äußeren Einflüssen geschützt wird. Außerdem besitzt jedes Virus auf seiner Oberfläche mindestens ein Protein, welches es dem Virus ermöglicht, in die Wirtszelle einzudringen oder zumindest seine Nukleinsäure einzuschleusen. Virale Oberflächenproteine bilden entweder selbst eine Eiweißhülle oder sind als Transmembranproteine in einer Lipidhülle verankert. Viele Viren, so auch alle RNA-Viren, kodieren für eine virale Polymerase, die für die Vermehrung des Virusgenoms notwendig ist [4].

Der Begriff Virus geht auf das lateinische Wort *virus* für Gift zurück. Die Bezeichnung stammt aus der Zeit, als der infektiöse Ursprung viraler Krankheiten unverstanden war. Erst nach Versuchen, in denen sich das „Gift“ nach mehrfacher Übertragung von Tier zu Tier nicht

verdünnte, wurde deutlich, dass den Krankheiten ein Vermehrungsprozess zu Grunde lag [5]. Viruspartikel sind sehr klein und entziehen sich so mit wenigen Ausnahmen der Sichtbarkeit im Lichtmikroskop. Die Größe infektiöser Partikel war deshalb historisch wichtig für die Unterscheidung zwischen Viren und anderen Erregern wie zum Beispiel Bakterien: Während sich die meisten Bakterien mit sehr feinen Filtern (0,2 µm) aus einer Suspension entfernen liessen, waren die meisten Viren zu klein für einen Größenausschluß. Viren wurden deshalb zuerst als ultrafiltrierbare Krankheitserreger definiert [6].

1.3 Die Ordnung *Mononegavirales*

Bei den *Mononegavirales* handelt es sich um Viren, deren Genom aus einem einzigen Strang einzelsträngiger RNA negativer Orientierung, also revers-komplementär zur kodierten mRNA, besteht. Das Genom kann deshalb nicht direkt translatiert werden, sondern muss zuerst in virale mRNAs umgeschrieben werden. Aus diesem Grund müssen *Mononegavirales*, im Gegensatz zu Positivstrang-RNA-Viren, eine virale RNA-abhängige RNA-Polymerase mit dem Nukleokapsid zusammen in die Wirtszelle einschleusen. Folglich ist das RNA-Genom allein nicht infektiös [7,8,9]

Die *Mononegavirales* teilen eine Reihe von strukturellen Eigenschaften: Das Nukleokapsid enthält Nukleokapsidproteine (N), die eng an die virale RNA gebunden sind, und Polymerasekomplexe, die aus Phosphoproteinen (P) und großen, katalytisch aktiven Polymeraseproteinen (*large protein*, L) bestehen, und ebenfalls mit der viralen RNA assoziiert sind. Das Nukleokapsid wird von einer Lipidhülle umgeben, in welche mindestens ein Transmembranprotein integriert ist, welches die Adhäsion des Virions an einen zellulären Rezeptor und die Fusion der viralen Lipidhülle mit einer Wirtsmembran (und oft auch die Abspaltung des Virus von zellulären Rezeptoren) vermittelt. Bei einigen Viren werden diese Funktionen von nur einem Protein wahrgenommen (z. B. bei dem Vesikulären-Stomatitis Virus (VSV), einem Rhabdovirus). Bei anderen *Mononegavirales*, so zum Beispiel bei Parainfluenzaviren, sind mehrere virale Oberflächenproteine an diesen Prozessen beteiligt.

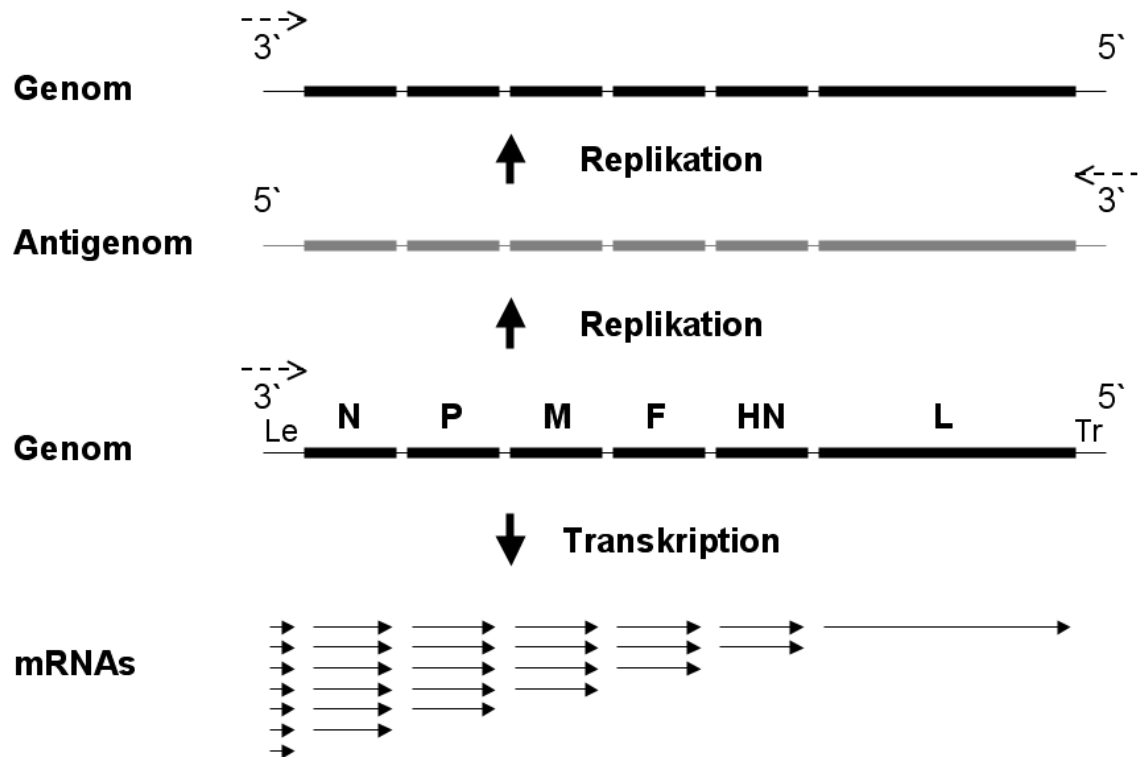


Abbildung 1.1: Replikationsmechanismus der *Mononegavirales*

Replikationsmechanismus am Beispiel des Genoms des Parainfluenzavirus Typ 3. Ausgehend vom Genom (Mitte) werden durch die virale Polymerase zuerst der *Leader* (Le) und die viralen mRNAs synthetisiert (Transkription, unten). Da die am 3'-Ende des Genoms lokalisierten Gene stärker exprimiert werden als jene nahe des 5'-Endes, bildet sich ein mRNA-Expressionsgradient. Im späteren Verlauf der Infektion kommt es zur Replikation des Genoms durch die virale Polymerase (oben), wobei als Zwischenprodukt das Antigenom gebildet wird.

Mononegavirales teilen außerdem den Mechanismus, welcher der RNA-Synthese zugrunde liegt (siehe Abbildung 1.1): Sowohl das virale Genom, als auch das während der Replikation entstehende, zum Genom revers-komplementäre Antigenom enthalten lediglich eine einzelne Initiationsstelle für die RNA-Synthese an ihrem jeweiligen 3'-Ende. Von dieser ausgehend werden sowohl Genom und Antigenom, als auch, ausgehend vom Genom, die viralen mRNAs abgelesen. Dabei entstehen einzelne monocistronische mRNAs dadurch, dass die Polymerase an den Gen-End-Signalen kurz vor den intergenischen Bereichen anhält, um in einem als „Stottern“ bezeichneten Mechanismus, die dort lokalisierte Oligo-U-Sequenz in einen Poly-A-Schwanz umzuschreiben. Anschließend kommt es zur Re-Initiation der Transkription am folgenden Gen-Start-Signal. Dabei dissoziiert jedoch der Polymerasekomplex in ca. 20 % der Fälle von der genomischen RNA, so dass vom jeweils folgenden Gen nur ca. 80 % der mRNA-Menge des vorangegangenen Gens synthetisiert werden [10]. Es entsteht der für die Transkription der *Mononegavirales* typische mRNA-Gradient. Die mRNAs werden

anschließend von den zellulären Ribosomen in Proteine translatiert. Zu einem späteren Zeitpunkt, abhängig von der Menge bereits synthetisierter viraler Proteine, verändert sich die enzymatische Aktivität des viralen Polymerasekomplexes und es beginnt die Replikation des Genoms. Dabei kommt es zu einem Überlesen der Gen-End-Signale, so dass das Antigenom als durchgehende und vollständige Kopie des Genoms entsteht. Vom Antigenom ausgehend wird in Folge wieder das Genom synthetisiert, das in die entstehenden Viruspartikel verpackt werden kann.

Zur Ordnung *Mononegavirales* gehören folgende Virusfamilien: Die *Rhabdoviridae* [11], die *Filoviridae* [12] und die *Paramyxoviridae* [13], deren Replikationszyklus ausschließlich im Cytosol der Wirtszellen abläuft, und die entfernter verwandten *Bornaviridae* [14], deren Replikation den Zellkern benötigt [15,16].

1.4 Humane Parainfluenzaviren

Die humanen Parainfluenzaviren wurden erstmals zwischen 1956 und 1960 aus Rachensekreten von Kindern mit akuten Atemwegserkrankungen isoliert [17].

Parainfluenzaviren gehören der Familie der Paramyxoviren (*Paramyxoviridae*) an, die wiederum in zwei Unterfamilien, die Paramyxoviren (*Paramyxovirinae*) und die Pneumoviren (*Pneumovirinae*), unterteilt ist. Die *Pneumovirinae* unterscheiden sich dabei anhand mehrerer Eigenschaften von den *Paramyxovirinae* [18].

Eine dieser Eigenschaften ist besonders wichtig für die hier vorgestellten Arbeiten:

Im Gegensatz zu den *Pneumovirinae* folgt die Genomlänge der *Paramyxovirinae* der so genannten Sechserregel (*rule of six*). Diese besagt, dass ausschließlich jene Genome effizient replizieren, deren Länge ein Vielfaches von sechs Nukleotiden ist ($6n+0$). Aus diesem Grund müssen auch neue, im Rahmen der Herstellung rekombinanter Viren in das Genom integrierte Nukleotidfolgen, immer ein Vielfaches von sechs darstellen [17].

In beiden Unterfamilien finden sich wichtige humanpathogene Viren. Zu den *Paramyxovirinae* gehören z.B. das Masern-Virus, das Mumps-Virus und die humanen Parainfluenzaviren Typ 1 bis 4 (hPIV 1-4), zu den *Pneumovirinae* z.B. das humane Respiratorische Synzytialvirus (hRSV) und das humane Metapneumovirus (hMPV) [19]. Parainfluenzaviren gehören zu den häufigsten Erregern der Laryngotracheobronchitis bzw. des Pseudokrups (PIV1) und viraler Bronchiolitiden und Pneumonien (PIV3) bei Kleinkindern [20].

Die humanen Parainfluenzaviren lassen sich wiederum in zwei Gruppen einteilen: Während das hPIV1 und das hPIV3 zu dem Genus *Respirovirus* gehören, bilden hPIV2 und hPIV4

zusammen mit anderen Viren das Genus *Rubulavirus*. Ursächlich für diese Unterscheidung sind neben dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad die antigenische Verwandtschaft der Viren, die Tatsache, dass das P-Protein der Rubulaviren wesentlich kleiner ist, als jenes der Respiroviren und die fehlende Konservierung der intergenischen Sequenz bei den Rubulaviren [17].

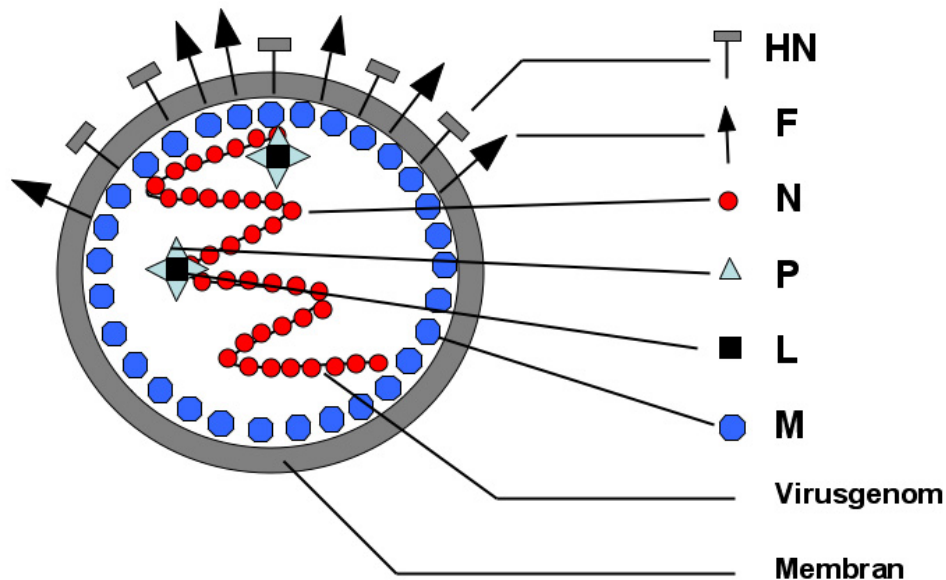


Abbildung 1.2: Struktur des humanen Parainfluenzavirus Typ 3

Das einzelsträngige nicht-segmentierte RNA-Genom in Negativstrang-Orientierung formt zusammen mit den Nukleokapsid-Proteinen das Nukleokapsid. Der Polymerasekomplex, bestehend aus Phosphoprotein (P) und *large protein* (L), ist mit dem Nukleokapsid assoziiert. Umgeben wird das Nukleokapsid von Matrix-Proteinen (M), welche die Verbindung zur Virusmembran herstellen. In diese sind die Oberflächenproteine, das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) integriert, welche die Anlagerung des Virus an die Wirtszelle und die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran vermitteln (verändert nach [5])

1.4.1 Das humane Parainfluenzavirus Typ 3

Das humane Parainfluenzavirus Typ 3 (hPIV3) ist neben dem hRSV die häufigste Ursache schwerer viraler Atemwegserkrankungen im Kleinkindalter (Bronchitis, Bronchiolitis, Pneumonie und Pseudokrupp) [21]. Kleinkinder können sich mehrfach in kurzen Abständen mit dem Virus infizieren. Für Erwachsene hingegen ist das Virus ungefährlich, soweit sie nicht immunkomprimiert sind.

Das 15.462 Basenpaare (bp) lange Genom des hPIV3 kodiert für sechs Gene, die jeweils für ein Strukturprotein kodieren, das im Virion enthalten ist (siehe Abbildung 1.2). Das Nukleokapsid-Protein (N) wird Histon-artig von der viralen RNA umwunden und ist notwendig für die Erkennung des Genoms durch die virale Polymerase. Das Polymerase-

Protein (L), das mit Abstand größte virale Protein des hPIV3, trägt das aktive Zentrum für die RNA-Synthese und wirkt sowohl als Replikase als auch als Transkriptase. Das Phosphoprotein (P) bindet an das L-Protein und ist Teil des viralen Polymerasekomplexes. Das Matrix-Protein (M) agiert als Bindeglied zwischen den viralen Oberflächenproteinen und dem Nukleokapsid und spielt eine wichtige Rolle in der Virusmorphogenese. Das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) und das Fusionsprotein (F) sind die beiden viralen Transmembranproteine. Das HN-Protein vermittelt die Bindung des Virus an Rezeptoren der Wirtszelle, während das F-Protein die Fusion zwischen der viralen Membran und der Zellmembran der Wirtszelle katalysiert. [22]. Das P-Gen ist das einzige Gen, das mehr als ein Genprodukt kodiert. Von einem weiteren offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) wird das so genannte C-Protein abgelesen, während sich durch RNA-editing, d.h. das Einfügen eines nicht kodierten Guanins an einer bestimmten Stelle während der Synthese der mRNA, das Leseraster des P-Gens verschiebt und dadurch insgesamt drei Proteine mit unterschiedlichen Carboxytermini entstehen (P, D, V) [17].

1.4.2 Das bovine Parainfluenzavirus Typ 3

Aufgrund der für die Virusvermehrung essentiellen Virus-Wirt-Interaktion kommt es im Verlauf der Evolution zur Anpassung des Virus an den jeweiligen Wirt, so dass eng verwandte Viren entstehen, die an den jeweils eigenen Wirt besonders gut angepasst sind.

Im Falle des Parainfluenzavirus Typ 3 existiert neben dem humanpathogenen hPIV3 ein an das Rind angepasstes bovines PIV3 (bPIV3), das in Rindern Atemwegserkrankungen verursacht. Die beiden Viren sind auf Proteinebene zwischen 59 % (P-Protein) und 90 % (M-Protein) identisch, während die Proteinsequenzen verschiedener hPIV3-Stämme zu über 95 % konserviert sind [22].

Das bPIV3 ist im Gegensatz zum hPIV3 nicht humanpathogen und vermehrt sich im Respirationstrakt seronegativer Kinder nur eingeschränkt, d.h. der maximale Titer im Verlauf einer Infektion beträgt ungefähr 1000 infektiöse Einheiten pro ml Rachenspülwasser, also ein Hundertstel des maximalen hPIV3-Titers [23]. Da eine bPIV3-Infektion trotzdem in eingeschränktem Maßstab hPIV3-neutralisierende Antikörper induziert – die hPIV3-neutralisierenden Antikörpertiter sind um den Faktor vier niedriger als die bPIV3-neutralisierenden Titer – wird bPIV3 derzeit als möglicher Jennerscher Impfstoff gegen hPIV3 erprobt [22,24].

1.5 Rekombinante Viren

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften der Viren ist es möglich, gentechnisch veränderte Viren *de novo* herzustellen. Für einige Virusfamilien ist es dazu lediglich notwendig, eine das Genom kodierende Nukleinsäure in die Wirtszelle einzuschleusen, für andere Virusfamilien ist dieser Prozess hingegen komplizierter.

Unter dem Begriff *rekombinante Viren* werden generell jene Viren subsumiert, die von einer Nukleinsäure ausgehend *de novo* hergestellt wurden. Dies betrifft sowohl jene Viren, deren Genom verändert wurde, als auch jene, deren Genom nicht manipuliert wurde, so dass das entstehende Virus nicht vom Wildtypvirus zu unterscheiden ist.

Viele Viren unterschiedlicher Virusfamilien sind mittlerweile der genetischen Manipulation zugänglich gemacht worden. In Folge dessen werden mit Hilfe gezielt veränderter Viren zunehmend verschiedene Fragestellungen der modernen biomedizinischen Wissenschaft bearbeitet und beantwortet. Auf der einen Seite werden rekombinante Viren in der klassischen Grundlagenforschung eingesetzt. So haben Untersuchungen der Virus-Wirt-Wechselwirkung stark von der Möglichkeit profitiert, gezielt veränderte Viren einzusetzen (z.B. [25]). Rekombinante Viren können jedoch auch als Vektoren zum Einschleusen von zusätzlicher genetischer Information in Zellen verwendet werden. Dies erlaubt nicht nur die Beantwortung zellbiologischer Fragestellungen, sondern auch den direkten therapeutischen oder immunprophylaktischen Einsatz am Patienten.

Zum einen wurden erfolgreich gentherapeutische Ansätze verfolgt, um Gene dauerhaft in das Genom menschlicher Zellen zu integrieren (z.B. [26]). Zum anderen werden erste Versuche unternommen, mit rekombinanten Viren gegen Infektionskrankheiten zu impfen. Derzeit ist noch kein rekombinantes Virus als humaner Impfstoff zugelassen. An Füchsen wurde jedoch bereits 1990 mit Hilfe eines rekombinanten Vakziniavirus eine erfolgreiche Impfkampagne gegen Tollwut in Belgien durchgeführt [27]. Außerdem befinden sich mehrere viel versprechende experimentelle Impfstoffe in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung [28].

1.5.1 Reverse Genetik an *Mononegavirales*

Reverse Genetik von RNA-Viren beschreibt das Herstellen eines Virus von einer cDNA, so dass der Phänotyp des Virus durch Manipulation der cDNA verändert werden kann.

Die *Mononegavirales* wurden im Vergleich zu den Positivstrang-RNA-Viren [29,30] relativ spät der rekombinanten Erzeugung zugänglich. Als erstes Virus der Ordnung *Mononegavirales* wurde 1994 die Erzeugung eines rekombinanten Tollwut-Virus

veröffentlicht [31]. Seitdem sind für die meisten relevanten humanpathogenen Mitglieder dieser Ordnung Systeme zur Herstellung der Viren, ausgehend von der jeweiligen cDNA des viralen Antigenoms, etabliert worden (siehe Tabelle 1.2)

Tabelle 1.2: Erste rekombinante *Mononegavirales*

Nachdem Schnell *et al.* 1994 die Herstellung rekombinanter *Mononegavirales* aus cDNA beschrieben hatten, wurden innerhalb kurzer Zeit zahlreiche Mitglieder aller Familien der *Mononegavirales* der genetischen Manipulation zugänglich (verändert nach [32]).

<i>Rhabdoviridae</i>		
Tollwut-Virus	1994	[31]
Vesikulares Stomatitis Virus	1995	[33]
Vesikulares Stomatitis Virus	1995	[34]
<i>Paramyxoviridae</i>		
Sendai Virus (PIV1 der Maus)	1995	[35]
Masernvirus	1995	[36]
Humanes Respiratorisches Synzytial Virus	1995	[37]
Humanes Parainfluenzavirus Typ 3	1997	[38]
Humanes Parainfluenzavirus Typ 3	1997	[39]
Simian Virus 5	1997	[40]
Rinderpest Virus	1997	[41]
Newcastle Disease Virus	1999	[42]
Bovines Respiratorisches Synzytial Virus	1999	[43]
Bovines Parainfluenzavirus Typ 3	2000	[44]
<i>Filoviridae</i>		
Ebola Virus	2001	[45]
<i>Bornaviridae</i>		
Borna Disease Virus	2005	[46]

Das Prinzip zur Herstellung (siehe Abbildung 1.3) ist dabei identisch für alle *Mononegavirales*: Rekombinante Viren können erhalten werden, indem Plasmide in eine Wirtszelle eingebracht werden, von denen (a) das Genom oder das Antigenom und (b) die mRNAs der zur RNA-Replikation notwendigen Proteine abgelesen werden [32]. Dies sind für alle *Mononegavirales* zumindest das Polymerase-Protein (L), das Phosphoprotein (P) und das Nukleoprotein (N). Im Falle der Herstellung von Filoviren und des humanen RSV muss zusätzlich die mRNA für ein weiteres Protein, welches die Transkription startet (Filoviren, [47]) oder für die Elongation der vollständigen Genom-RNA unverzichtbar ist (hRSV, [37]), auf einem zusätzlichen Plasmid in die Zelle eingebracht werden.

Es werden prinzipiell zwei Ansätze verfolgt, um von der in die Zelle eingebrachten cDNA zur Synthese der notwendigen RNAs zu gelangen. Ältere Systeme sind dabei auf die Verwendung eines die T7-Polymerase exprimierenden Helfervirus [48] angewiesen, während neuere

Systeme auf dieses Virus bewusst verzichten.

Die älteren Systeme verwenden Plasmide, von welchen die notwendigen RNAs mit Hilfe der T7-Polymerase transkribiert werden. Da die T7-Polymerase aus dem gleichnamigen Bakteriophagen stammt, also in eukaryotischen Zellen nicht exprimiert ist, muss diese zusätzlich in den Wirtszellen exprimiert werden. Um dies zu erreichen wird zusammen mit der Transfektion der Plasmide in die Zielzellen die Zellkultur mit MVA-T7 infiziert. Dabei handelt es sich um ein attenuiertes Vakziniavirus des Stammes Ankara [49], welches die T7-Polymerase sehr effizient exprimiert [50]. Der Vakziniavirus-Stamm MVA vermehrt sich nicht in eukaryotischen Zelllinien oder humanen Zellen, mit der Ausnahme der Hamster-Nierenzelllinie BHK [51], so dass nach erfolgreicher Herstellung der rekombinanten RNA-Viren in HEp2-Zellen und der ersten Passagierung in LLC-MK2-Zellen kein MVA-T7 mehr nachweisbar ist.

Ziel neuerer Systeme ist es, eine Hilfsvirus-Infektion zu vermeiden, da die Erzeugung von medizinischen Produkten und Impfstoffen aus Sicherheitsgründen stark reglementiert ist, und das Einbringen weiterer Viren in die Zellkultur als potentiell Risiko und nachteilig bei der Zulassung der Produkte angesehen wird [52]. Auf der einen Seite werden in diesen Systemen statt des MVA-T7 Plasmide verwendet, von welchen die T7-Polymerase unter Kontrolle starker viraler Promotoren von zellulären Polymerasen transkribiert wird [53,54]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Zelllinien zu verwenden, die stabil mit der T7-Polymerase-Gen transfiziert sind [43].

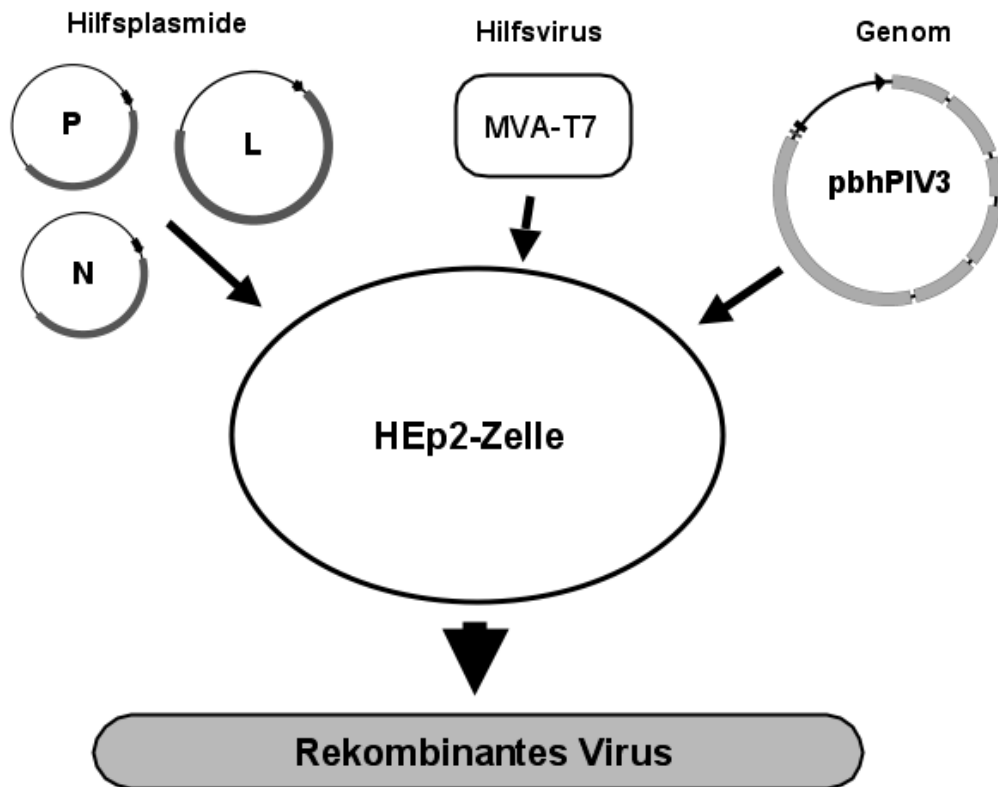


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines rekombinanten Genetiksystems zur Herstellung von *Mononegavirales* am Beispiel des bhPIV3

Um von der cDNA des viralen (-)Strang-RNA-Genoms ausgehend ein rekombinantes Virus zu generieren, müssen mehrere RNAs in der Zelle exprimiert werden. Erreicht wird dies durch die Transfektion von HEp2-Zellen mit vier verschiedenen Plasmiden, welche für den Polymerasekomplex und das virale (+)Strang-Antigenom kodieren. Die Synthese der RNAs steht dabei unter Kontrolle des Promotors der T7-Polymerase, welche durch Infektion mit einem rekombinanten Hilfsvirus in die Zelle gelangt. Treffen alle vier Plasmide und das Virus ein und dieselbe Kulturzelle, gehen mit hoher Wahrscheinlichkeit rekombinante Viren aus dieser hervor.

1.6 Die bovin-humane Chimäre des Parainfluenzavirus Typ 3 (bhPIV3)

Derzeit existiert kein lizenziertes Impfstoff gegen das humane Parainfluenzavirus Typ 3. Deshalb wird auf verschiedenen Wegen versucht, hPIV3 abzuschwächen, um ein attenuiertes Impfvirus zu erhalten. Ziel ist es, dass ein solches Virus auf der einen Seite Säuglingen und Kleinkindern intranasal verabreicht werden kann, ohne dass diese erkranken, auf der anderen Seite jedoch ausreichend Replikation stattfindet, um eine protektive Immunantwort hervorzurufen. Neben dem klassischen Ansatz, das Virus abzuschwächen, indem es seriell außerhalb des Wirtes passagiert wird [55], verspricht hier die reverse Genetik, rational und

effizient adäquat attenuierte Viren generieren zu können.

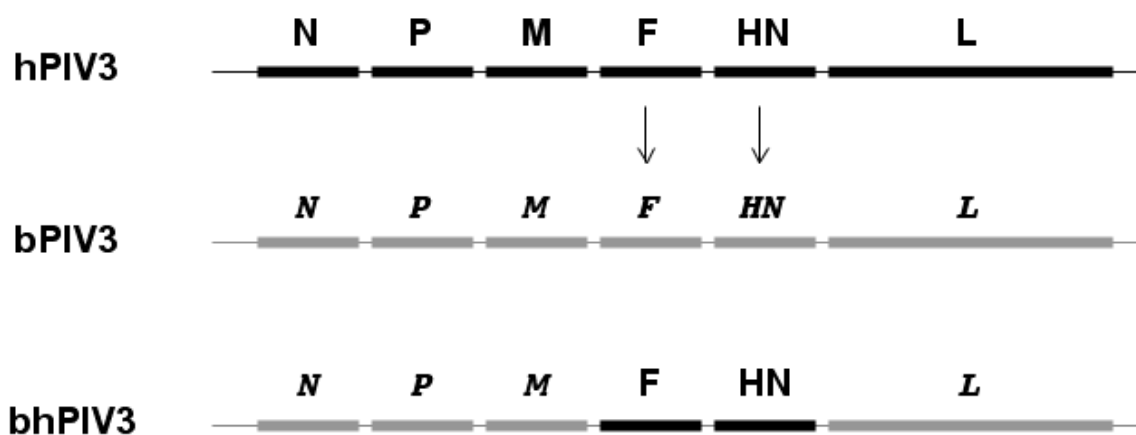


Abbildung 1.4: Genaustausch zwischen hPIV3 und bPIV3 führt zum Genom des bhPIV3

Bei der Herstellung des Genoms des bhPIV3 wurde anstelle der Oberflächenproteine des bPIV3 jene des hPIV3 in das cDNA-generierte Virusgenom integriert.

Unter anderem wurde mittels reverser Genetik eine aus hPIV3 und bPIV3 bestehende Chimäre hergestellt, welche die Oberflächenproteine des humanpathogenen Virus exprimiert, während die anderen Gene aus dem bovinpathogenen Virus stammen (siehe Abbildung 1.4). Die Arbeit wurde annähernd gleichzeitig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt und vorgestellt [44,56]. Die auf diese Weise hergestellten Viren zeigten den erhofften Phänotyp: Sie waren im Rhesusaffen attenuiert, riefen jedoch weiterhin einen Immunschutz hervor [44,57].

1.7 Das bhPIV3 als Vektor gegen virale Antigene

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Attenuierung des bhPIV3 in Primaten wurde in einer Serie verschiedener Versuche das Virus als Vektor für die Expression weiterer viraler Antigene verwendet (siehe Abbildung 1.5). Innerhalb dieser Versuche zeigte sich schnell, dass rekombinante bhPIV3, welche zusätzlich Oberflächenproteine anderer Viren exprimieren, als Kombinationsimpfstoff sowohl gegen das hPIV3 als auch gegen ein weiteres Virus einsetzbar sind.

In den Jahren 2001 und 2002 stellte das *National Institutes of Health der USA* (NIH) Ergebnisse aus Versuchen mit bhPIV3-Vektoren vor, welche zusätzlich zu den bhPIV3-Genen die Oberflächenproteine des hRSV exprimierten. Sowohl in Hamstern [58] als auch in Rhesusaffen [59] wurden positive Resultate bezüglich des vermittelten Impfschutzes erzielt.

2004 wurden diese Resultate von einer zweiten Arbeitsgruppe bestätigt [60]. Im Unterschied zum NIH-Versuch wurden die Versuche nicht an Rhesusaffen sondern an Meerkatzen durchgeführt, und es kam zusätzlich ein Virus zum Einsatz, welches für das F-Protein des RSV in einer Form kodierte, die zu einer Sezernierung desselben statt zu einer Membranverankerung führte. Mit beiden Ansätzen konnte eine Schutzwirkung erzielt werden.

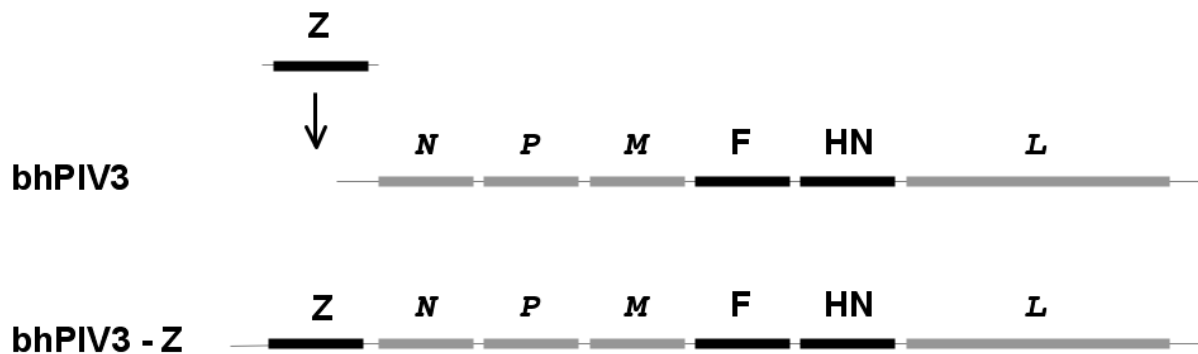


Abbildung 1.5: Das bhPIV3 als Vakzin-Vektor für Fremdantigene

Durch die Integration einer zusätzlichen Geneinheit (Z) in das Genom kann ein weiterer Antigen exprimiert werden. Eine Promotor-proximale Position der Integration verspricht dabei aufgrund der Gradientenbildung die höchste Expression.

Bereits ein Jahr zuvor veröffentlichten Tang et al. Ergebnisse von Impfversuchen an Syrischen Goldhamstern, denen rekombinante bhPIV3 verabreicht worden waren, welche zusätzlich entweder Oberflächenproteine von hRSV oder hMPV exprimierten. Dabei wurde auch die Expression der zusätzlichen Antigene aus der ersten mit jener aus der zweiten Position des Genoms verglichen [61]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der anderen Versuche wurde auch hier ein Schutz gegen hPIV3 und zusätzlich gegen hRSV bzw. hMPV erreicht.

Im Jahr 2004 beschrieben Buchholz et al. und Bukreyev et al. den Einsatz von bhPIV3 als Impfvektor gegen das SARS-Coronavirus. Mit bhPIV3-Viren, welche SARS-Proteine exprimierten, konnte in Hamstern eine starke Antikörperantwort induziert werden [62], Meerkatzen waren nach Applikation gegen die Infektion mit SARS-Coronavirus geschützt [63].

1.8 EGFP

Das grün-fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) der Tiefseequalle *Aequorea victoria* wurde bereits 1962 erstbeschrieben [64,65]. Über 30 Jahre später wurde es nach

seiner Klonierung [66] und dem Nachweis, dass das Protein ohne enzymatischen Einfluss anderer Proteine in eukaryotischen Zellen Fluoreszenz entwickelt [67,68], innerhalb kürzester Zeit zu einem wichtigen Werkzeug der zellbiologischen Forschung [69]. So wurde es unter anderem für Promotorstudien, die Untersuchung zellulärer Lokalisation einzelner Protein oder auch für den Nachweis der Interaktion zweier Proteine eingesetzt [70].

GFP wird in der Virologie häufig eingesetzt, um erfolgreiche Infektionen mit rekombinanten Viren einfach darstellen zu können. Dabei wird rekombinanten Viren zusätzlich das GFP-Leseraster in das Genom eingefügt, so dass bei erfolgreicher Virus-Vermehrung befallene Wirtszellen im Fluoreszenzmikroskop oder mittels Durchflußzytometrie aufgrund ihrer Fluoreszenz einfach zu erkennen sind [71].

Anstatt des Wildtyp-Proteins wird bei vielen Anwendungen eine *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) genannte Gen-Variante eingesetzt, bei der die Aminosäure-Kodons für die Expression in eukaryotischen Zellen optimiert und einige Aminosäuren ausgetauscht wurden, so dass eine höhere Stabilität und bessere Fluoreszenzeigenschaften erreicht wurden [72].

1.9 Die Baumwollratte als Versuchstier

Bei den Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) handelt es sich um eine in Nord- und Mittelamerika weit verbreitete Nagetierspezies. Sie gehört zur gleichnamigen Gattung der Baumwollratten (*Sigmodon*) in der Unterfamilie der Neuweltmäuse (*Sigmodontinae*). Diese wiederum wird in die Familie der Langschwanzmäuse (*Muridae*) eingeordnet, zu welcher unter anderem auch die Gattungen der echten Mäuse (*Mus*) und der Ratten (*Rattus*) gehören. Es werden zehn Arten der Baumwollratte unterschieden [73], von denen jedoch lediglich die Art *Sigmodon hispidus* Bedeutung in der medizinischen Wissenschaft hat [74].

Wildlebende Baumwollratten werden ca. 150 g schwer und erreichen eine Körperlänge von knapp 30 cm. Ihre Bedeutung für die medizinische Forschung erhalten sie durch ihre hohe Permissivität für viele verschiedene Pathogene, darunter viele Viren [75]. So wurden Baumwollratten als eine der ersten Tierarten erfolgreich mit Polioviren infiziert [76]. Auch für Infektionsversuche mit *M. tb.* ist die Baumwollratte geeignet [77]. Aus der Familie der *Paramyxoviridae* wurden unter anderen manifeste Infektionen mit RSV [78], mit hMPV [79] und auch mit hPIV3 [80,81,82,83] beschrieben.

1.10 Das *Mycobacterium tuberculosis*

Jährlich erkranken weltweit mehr als acht Millionen Menschen an Tuberkulose und zwei Millionen Menschen sterben an der Erkrankung [84]. Der wichtigste Tuberkulose-Erreger, das *M. tb.* gehört neben dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) und dem Malaria-Erreger

Plasmodium falciparum zu den drei Krankheitserregern, die weltweit die meisten Todesopfer fordern. Tuberkulose ist gleichzeitig die im Hinblick auf die Mortalität wichtigste bakterielle Infektionskrankheit. Die Zahl der derzeit mit *M. tb.* infizierten Menschen wird auf über zwei Milliarden geschätzt, von denen ca. 20 Millionen an offener Lungentuberkulose erkrankt sind [85]. *M. tb.* ist ein stäbchenförmiges, unbewegliches, aerobes Bakterium, das mit den anderen Mykobakterien die Eigenschaften teilt, sehr langsam zu wachsen und eine sehr massive Zellwand aufzuweisen. Die meisten mykobakteriellen Infektionen führen nicht zu einer manifesten Erkrankung. Erst wenn das Immunsystem geschwächt ist, sei es durch Mangelernährung oder Immundefizienz, welche häufig durch eine HIV-Infektion hervorgerufen wird, kommt es zur klinischen Erkrankung [86]. Neben *M. tb.* existieren mehrere Mykobakterien, die Tuberkulose hervorrufen können, so z.B. *M. bovis*, *M. magerit*, und *M. africanum*. Diese bilden mit *M. tb.* zusammen den so genannten Tuberkulose-Komplex der Mykobakterien.

1.10.1 *M. tb.*-Infektion

M. tb. wird am häufigsten durch Tröpfcheninfektion übertragen, die Lunge ist dabei nicht nur Einfallstor sondern auch Ort der Erstinfektion. Die eingeatmeten Bakterien werden zuerst von Alveolarmakrophagen aufgenommen, die eine entscheidende Rolle sowohl in der Etablierung der Infektion als auch in ihrer Bekämpfung spielen. Da *M. tb.* die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom verhindert, entgeht es der Inaktivierung durch den Makrophagen und der Präsentation gegenüber dem Immunsystem und kann sich fortan im Inneren der Zelle vermehren. Die *M. tb.*-Infektion teilt sich in mehrere Phasen, wobei die Primärinfektion vom Individuum meist gut kontrolliert wird. Die befallenen Makrophagen produzieren die Interleukine IL-12 und IL-18 und aktivieren dadurch eine T_H1 -Immunantwort. In Folge kommt es zu einer massiven Ausschüttung von $IFN-\gamma$ durch aktivierte $CD4^+$ -T-Lymphozyten und zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen. Schließlich entstehen am Ort der bakteriellen Vermehrung so genannte *Granulome*, in denen aktivierte Makrophagen von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen eingeschlossen werden. Diese Granulome stellen sich histologisch als kleine Knötchen dar, die aus einem nekrotischen Zentrum und einem Saum aus Epitheloidzellen bestehen (Primäraffekt). Dieser Primäraffekt bildet zusammen mit einem oder mehreren lokalen geschwollenen Lymphknoten den Primärkomplex. Eine Freisetzung von Mykobakterien ist in dieser geschlossenen Form unterbunden. Die Infektion tritt in der Regel in eine Latenzphase ein, die bei vielen Infizierten ein Leben lang anhält - lediglich 5-10 % der Infizierten entwickeln Symptome. Erst im Falle einer Schwächung des Immunsystems kommt es zur Re-Aktivierung der Mykobakterien, und eine

Postprimärtuberkulose entsteht, die sich systemisch ausbreiten kann [87].

In mehreren Versuchen hat sich deutlich gezeigt, dass die T_H1 -Antwort essentiell für die Kontrolle der *M. tb.*-Infektion ist. Außerdem spielen Stickstoffmonoxid-Radikale eine entscheidende Rolle für die erfolgreiche Abtötung der Mykobakterien [88,89,90].

M. tb. kann mit einer langwierigen medikamentösen Kombinationstherapie erfolgreich behandelt werden, doch die Zunahme von Resistenzen erschwert die Behandlungen erheblich. Neben den schon seit Längerem beschriebenen multiresistenten (*multi-drug resistant*, MDR) *M. tb.*-Stämmen und sich immer weiter ausbreitenden extrem resistenten (*extensive drug resistant*, XDR) *M. tb.*-Stämmen, welche auch gegen Medikamente der zweiten Wahl resistent sind [91], wird die Situation durch Co-Infektion mit HIV weltweit und insbesondere in den Entwicklungsländern dramatisch verschärft [92].

1.10.2 Das *Bacille Calmette-Guérin*

Das *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) ist der einzige lizenzierte Impfstoff gegen Tuberkulose. Das BCG ist ein attenuiertes *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), welches zu den humanpathogenen Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes gehört, und eng mit *M. tb.* verwandt ist. Albert Calmette und Camille Guérin passagierten diesen Stamm 13 Jahre lang, bis der Erreger einen Teil seines Genoms und seine Pathogenität verlor [93].

BCG ist das weltweit am häufigsten angewandte Vakzin. Schätzungsweise 85 % der Weltbevölkerung sind mit BCG gegen *M. tb.*-Infektionen immunisiert. Die Effizienz der BCG-Immunisierung im Hinblick auf die Lungentuberkulose ist jedoch umstritten. In verschiedenen Studien schwankt die Effizienz der BCG-Immunisierung erheblich (zwischen 80 % und 0 %) [94]. Das Missverhältnis zwischen der Zahl der geimpften Individuen und der gleichwohl hohen Zahl an Infektionen spricht zusätzlich eine deutliche Sprache. Es herrscht jedoch Einigkeit darüber, dass BCG vor den schwersten Manifestationen der Tuberkulose, wie z.B. Miliartuberkulose oder tuberkulöser Meningitis schützt. Diese Wirkung scheint vor allem im Kindesalter signifikant zu sein [95].

Die Frage, weshalb das BCG einen attenuierten Phänotyp aufweist, wird seit langem intensiv diskutiert. Die Beschreibung der im Vergleich zu pathogenen Mykobakterien deletierten Bereiche im Genom des BCG [96] stand dabei am Anfang der Klärung dieser Fragestellung. Da mittlerweile das Genom des *M. tb.*-Referenzstamms *H37Rv* [97] und auch das Genom eines *M. bovis*-Stamms [98] vollständig sequenziert sind, sind die Unterschiede zwischen BCG und *M. tb.* auf Nukleinsäureebene gut bekannt. Der Verlust der 9,5 kB langen *region of difference 1* (RD1) des Genoms, in der sowohl ein Sekretions-Apparat als auch starke, sekretierte Antigene des *M. tb.* kodiert sind, trägt maßgeblich zur Attenuation, aber eventuell

auch zur Reduktion der Immunogenität des BCG bei [99]. Nachdem Albert Calmette und Camille Guérin in ersten Versuchen die Harmlosigkeit des BCG festgestellt hatten, wurde das BCG weltweit an verschiedene Institute weitergegeben und dort weiter passagiert. Während der Ursprungstamm verloren ging, entwickelten sich so verschiedene BCG-Stämme, die sich vielfach unterscheiden. Diese unterschiedlichen Stämme, denen teilweise unterschiedliche Effizienz zugeschrieben wird, sind heute Gegenstand intensiver Forschung [100].

1.10.3 Neue Impfstoffe gegen Tuberkulose

Aufgrund der offensichtlichen Schwächen des BCG als Impfstoff wird seit langer Zeit intensiv nach einem neuen, potenteren Impfstoff gegen Tuberkulose gesucht. Die Entwicklung neuer Impfstoffe steht auch im Zentrum der Anti-Tuberkulose-Kampagne der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [101,102]. Da *M. tb.* jedes Jahr mehrere Millionen Menschenleben fordert, würde schon eine moderate Steigerung der protektiven Effizienz eines Impfstoffes einen großen Einfluss auf die Gesamtmortalität und -morbidity haben [103].

In der Impfstoffentwicklung gegen *M. tb.* werden derzeit verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wird versucht, einen Impfstoff zu entwickeln, der besser schützt als das BCG, und der sowohl Neugeborenen als auch Erwachsenen anstelle von BCG gegeben werden kann. Auf der anderen Seite wäre es bereits ein großer Erfolg, einen Impfstoff zu entwickeln, der in Kombination mit BCG zu einem besseren Schutz führt. Dies wäre wünschenswert und praktikabel, da die meisten Individuen in Hochrisikoländern bereits als Neugeborene mit BCG geimpft werden. Darüber hinaus ist die hohe Zahl der latent mit *M. tb.* infizierten Individuen eine besondere Herausforderung für die Impfstoffentwicklung, doch scheint ein therapeutischer Impfstoff gegen Tuberkulose noch in weiter Ferne [95].

Derzeit werden einige viel versprechende experimentelle Impfstoffe gegen *M. tb.* in klinischen Studien evaluiert, andere sind in der präklinischen Testung weit vorangeschritten [104]. In diesen potentiellen *M. tb.*-Impfstoffen der zweiten Generation spiegelt sich die Vielfalt der Möglichkeiten wider, protektive Immunität zu induzieren. So finden sich in diesen Studien unter anderem abgetötete nicht pathogene Mykobakterien [105,106], rekombinante BCG-Stämme [107,108,109], Protein-Impfstoffe [110,111] und virale Vektoren als Kandidaten-Impfstoffe [28].

Besonders bemerkenswert im Kontext der hier vorgestellten Arbeit sind die klinischen Studien zur Evaluierung eines rekombinanten Vakziniavirus, welches das immundominante *M. tb.*-Antigen AG85A als zusätzliches Gen exprimiert (MVA-AG85A[28]). Vorhergehende Versuche hatten ergeben, dass das Virus in Mäusen eine starke T-Zell-Antwort induziert [112].

Außerdem war dieses Vakzin das erfolgreichste Vakzin in einem großen Vergleichsversuch in Meerschweinchen [113]. Erste veröffentlichte Ergebnisse der klinischen Versuche zeigen nun, dass MVA-AG85A die zelluläre Antwort der vorangegangenen BCG-Impfung zu verstärken in der Lage ist [114], doch ist es zu früh, um einen additiven protektiven Effekt abschätzen zu können.

1.10.4 Tiermodelle zur Überprüfung der Wirksamkeit von potentiell anti-mykobakteriellen Impfstoffen

Die erste präklinische Evaluation von potentiellen anti-mykobakteriellen Impfstoffen findet in der Regel in Kleintier-Modellen für die primäre Tuberkulose-Infektion statt.

1.10.4.1 Das Maus-Modell zur Evaluation von *M.tb*-Impfstoffen

Das Maus-Modell ist in nahezu allen Evaluationen das erste Modell, für die Testung potentieller *M. tb*-Impfstoffe. Die großen technischen Vorteile dieses Modells sind, dass die Maus einfach zu halten ist, dass es eine große Auswahl an Antikörpern, Assays und anderen Diagnostika gibt, mit denen verschiedene Fragestellungen beantwortet werden können, und dass die *knock-out*-Technologie es ermöglicht, im Mausmodell den Beitrag einzelner Genprodukte in der mykobakteriellen Infektion zu untersuchen. Hinzu tritt, dass ein Konsens darüber herrscht, dass eine Abnahme des Bakterientiters in der Lunge infizierter Mäuse ein gutes Korrelat zur Wirkung der potentiellen Impfstoffe in Primaten ist [115]. Nachteilig am Mausmodell ist allerdings der nur moderate Schutzeffekt der BCG-Immunisierung für die Lunge der Maus, welcher dazu führt, dass bei nachfolgender Infektion mit *M. tb* der Bakterientiter häufig lediglich um den Faktor 10 reduziert ist (siehe Abbildung 1.6A).

1.10.4.2 Das Meerschweinchen-Modell zur Überprüfung von *M.tb*-Impfstoffen

Es werden zwei verschiedene Untersuchungen zur Wirksamkeit von anti-*M. tb*-Impfstoffen im Meerschweinchen durchgeführt. Zum einen handelt es sich dabei um Versuche, in deren Rahmen – analog zu den Infektionsversuchen an der Maus – die infizierten Tiere nach einer Inkubationszeit von wenigen Wochen getötet werden, um den Bakterientiter in der Lunge zu bestimmen. Der Vorteil des Meerschweinchen-Modells gegenüber dem Maus-Modell besteht dabei darin, dass die BCG-Immunisierung den Bakterientiter um den Faktor 100 verringert, so dass Unterschiede in der Effizienz einzelner Impfstoffe besser gemessen werden können [116]. Der zweite Versuchsansatz basiert darauf, dass nicht immunisierte Meerschweinchen innerhalb weniger Monate an *M. tb*-Infektionen verenden. Aus diesem Grund kann der Effekt eines Impfstoffs anhand der relativen Überlebenszeit einzelner Versuchsgruppen zueinander

bestimmt werden (siehe Abbildung 1.6B) [117]. Diese Art der Testung protektiver Immunität scheint stringenter als die Testung in Mäusen. Viele nach Versuchen an Mäusen aussichtsreiche Impfstoffe scheitern daran, die Überlebenszeit in Meerschweinchen signifikant zu verlängern, jedoch ohne dass dies die Wirksamkeit im Menschen ausschließt [113].

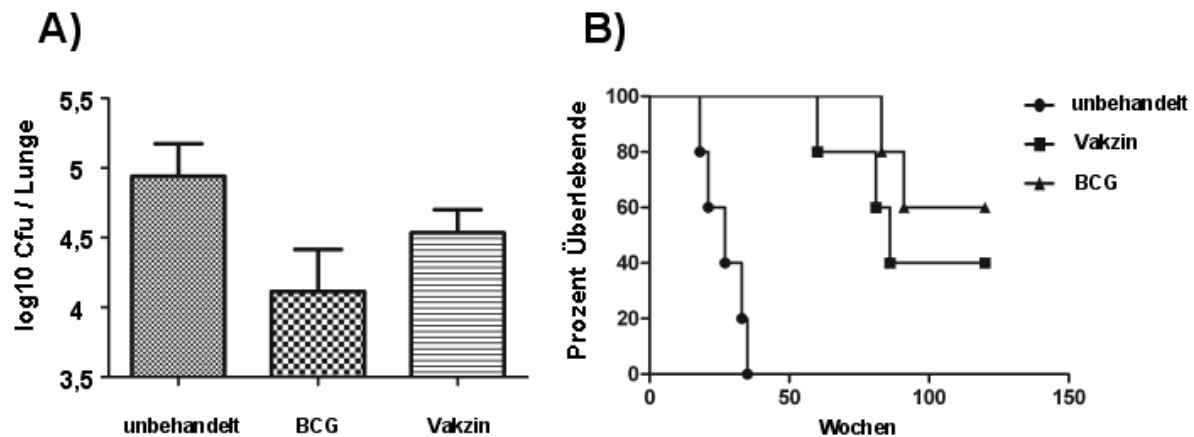


Abbildung 1.6: Beispielergebnisse für Kleintiermodelle zur Validierung von *M. tb.*-Impfstoffen
A) Kurzzeit-Infektion im Mausmodell. BCG senkt den Titer der Bakterien im Vergleich zur unbehandelten Gruppe um den Faktor 10.
B) Überlebenskurve für Langzeit-Infektionen in Meerschweinchen. Eine BCG-Immunisierung erhöht die Überlebenszeit der Tiere erheblich. Abbildung verändert nach [116].

1.10.5 Protektive Antigene des *M. tb.*

Im Laufe der Jahre wurden viele der von *M. tb.* exprimierten Proteine auf ihre Antigenität hin untersucht. Diese Untersuchungen wurden durch die molekularbiologische Charakterisierung der im BCG deletierten Genom-Abschnitte [96], gefolgt von der kompletten Sequenzierung des Genoms des *M. tb.* [97] und des *M. bovis* [98] stark beschleunigt. Die folgenden Antigene wurden aufgrund ihrer hohen Antigenität [118] im Rahmen dieser Arbeit für Immunisierungsversuche mit rekombinanten Viren verwendet.

1.10.5.1 AG85A

Das AG85A bildet zusammen mit den eng verwandten Proteinen AG85B und AG85C den AG85-Komplex. Dieser Komplex ist einer der bestbeschriebenen Antigenkomplexe des *M. tb.*. Grund dafür ist, dass der AG85-Komplex in der von den Mykobakterien ausgeschütteten Proteinfraction, dem Kulturfiltrat, in hoher Konzentration vorhanden ist und leicht isoliert werden kann. Dem Komplex werden Funktionen bei der Synthese der mykobakteriellen Zellwand zugeschrieben [119]. Die Proteine des AG85-Komplexes bilden die Grundlage mehrerer aussichtsreicher experimenteller Impfstoffe [28,111].

1.10.5.2 Cfp10

Das Kulturfiltratprotein 10 (*culture filtrate protein* 10, Cfp10) gehört zu den in der RD1 (siehe 1.10.2) kodierten Proteinen des *M. tb.*. Das Cfp10-Gen ist also im Genom des BCG nicht vorhanden und das potente T-Zell-Antigen [120], wird von diesem folglich nicht exprimiert. Eine hohe Bedeutung erfährt Cfp10 dadurch, dass anhand der Immunreaktion gegen dieses Protein diejenigen Individuen, die mit BCG geimpft wurden, von jenen unterschieden werden können, deren Immunsystem eine Reaktion auf *M. tb.* zeigt [121].

1.10.5.3 HspX

Das intrazelluläre Hitzeschockprotein X (*heat shock protein* X, HspX), auch als α -Crystallin bekannt, ist ein intrazelluläres Protein, das über viele Spezies der Mykobakterien hinweg konserviert ist. Es wird als sogenanntes Latenzantigen während der Latenzphase stärker exprimiert als zu Beginn der *M. tb.*-Infektion [122]. Außerdem ist HspX ein starkes T-Zell-Antigen. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften prädestiniert das Antigen als Kandidaten für die Entwicklung eines therapeutischen Impfstoffs [123].

1.10.5.4 Mtb8.4

Bei dem Mtb8.4-Protein handelt es sich um ein weiteres Kulturfiltratprotein des *M. tb.*. Es wurde als starkes T-Zell-Antigen beschrieben [124] und bewirkte nach Gabe als DNA-Vakzin einen hochgradigen Schutz gegen die *M. tb.*-Infektion in Mäusen [125].

1.10.5.5 Rv3407

Das Protein Rv3407 wurde in einem Proteom-Analyse-Versuch als eines jener Proteine identifiziert, die zwar sowohl im BCG- als auch im *M. tb.*-Genom enthalten sind, jedoch von BCG nicht exprimiert werden. Ein Vakzinierungsversuch an Mäusen zeigte, dass eine DNA-Immunisierung als *Boost* nach BCG-Impfung einen additiven Schutzeffekt gegenüber *M. tb.*-Replikation in der Lunge zur Folge hat [126].

2 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung lässt sich in vier Teile gliedern, die jeweils aufeinander aufbauen:

Zuerst sollte ein am NIH verwendetes reverses Genetiksystem zur Erzeugung rekombinanter bhPIV3 in einem neuen Labor an der Charité etabliert werden. Dieser Schritt beinhaltete den Aufbau aller dazu notwendigen molekularbiologischen und virologischen Methoden. Insbesondere sollten Methoden zum Nachweis der Viren, zur Bestimmung des Virustiters und zur Bestimmung des Titers neutralisierender Antikörper aufgebaut und optimiert werden.

Die Aufgabenstellung beinhaltete weiterhin die Auswahl mehrerer potentiell protektiver Antigene des *M. tb.*, welche in parainfluenzaviralen Vektoren mukosal exprimiert werden sollten. Dazu mussten die entsprechenden Gene zuerst zusammen mit virusspezifischen flankierenden Regionen auf Plasmidebene in das virale Antigenom integriert werden, um von diesen neuartigen Plasmiden ausgehend neue rekombinante Viren erzeugen zu können.

Nach der Herstellung sollten die Identität und die replikatorische Kapazität der Viren in vitro überprüft werden. Dafür sollte die Sequenz der eingebrachten Geneinheiten kontrolliert und die Expression der zusätzlichen Antigene im Western-Blot nachgewiesen werden. Um die replikatorische Kapazität der Viren zu überprüfen sollte anschließend eine multizyklische Wachstumskurve erstellt werden, innerhalb derer die Vektoren mit bhPIV3 ohne weiteres Antigen und hPIV3 verglichen werden sollte.

Des Weiteren beinhaltete die Aufgabenstellung die Evaluierung der rekombinanten Viren in zwei unabhängigen Tierversuchen. An Mäusen sollten die viralen Vektoren auf ihre Wirksamkeit als Impfstoffe gegen pulmonale und systemische Tuberkulose überprüft werden. Außerdem sollte der Attenuierungsphänotyp der Vektoren in Baumwollratten im Vergleich zu bhPIV3 und hPIV3 evaluiert werden.

3 Material

3.1 Bakterien

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien des Stammes XL1-blue verwendet.

3.2 Zellen

Für die Versuche an eukaryotischen Zellen und die Virusvermehrung kamen unterschiedliche Zelllinien zum Einsatz:

Zelllinie	Abstammung	ATCC Number
A549	Humanes Lungen-Karzinom	CCL-185
HEp2	Abkömmling der humanen Adenokarzinom-Zelllinie HeLa (ATCC: CCL-2)	CCL-23
LLC-MK2	Nierenepithelzelllinie des Rhesusaffen	CCL-7
BHK	Nierenfibroblastenzelllinie des Syrischen Goldhamsters	CCL-10
Jurkat	Humane T-Zelle aus akuter Leukämie	TIB-152
THP-1	Humane Monocytenzelllinie aus akuter Leukämie	TIB-202

Die adhärent wachsenden Zelllinien A549, HEp2, LLC-MK2 und BHK-Zellen wurden direkt von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, USA) bezogen. Die in Suspension wachsenden humanen Immunzelllinien Jurkat und THP-1 wurden freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Guthmann der Klinik für Neonatologie, CCM der Charité Berlin zur Verfügung gestellt.

Alle Zellen mit Ausnahme der Linie HEp2 können unter *biosafety level 1* (BSL-1) Bedingungen kultiviert werden, da sie als nicht human-pathogene biologische Materialien gelten. HEp-2-Zellen hingegen müssen unter BSL-2 Bedingungen gehandhabt werden, da in ihrem Genom Sequenzen von potentiell humanpathogenen Papova-Viren nachgewiesen

wurden. Für die hier vorgestellten Arbeiten war dies jedoch unerheblich, da alle Arbeiten mit Parainfluenzaviren ohnehin als BSL-2 Arbeiten durchgeführt werden mussten. Die Kultivierung aller Zelllinien und Viren fanden ausschließlich in für BSL-2 Arbeiten zugelassenen Räumlichkeiten statt.

3.3 Viren

Neben den in dieser Arbeit *de novo* erzeugten rekombinanten Parainfluenzaviren, wurde mit zwei weiteren Viren gearbeitet. Zum einen wurde humanes Parainfluenzavirus Typ 3, Stamm C243 vom Robert Koch Institut (RKI) Berlin zur Verfügung gestellt und in unserem Labor propagiert. Zum anderen wurde das MVA-T7 (siehe 1.5.1) von Bernard Moss (NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt und ebenfalls in unserem Labor weiter propagiert.

3.4 Plasmide und Nukleinsäuren

Sieben verschiedene Plasmide wurden für Klonierung und Herstellung der rekombinanten Viren verwendet.

Das pGEM-T (Promega, Mannheim), das pUC19 (Invitrogen, Karlsruhe) und das pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, USA) sind kommerziell erhältliche Plasmide, wobei das letztere nicht mehr vertrieben wird.

Die zum rekombinanten Genetiksystem gehörenden Plasmide wurden vom Laboratory of Infectious Diseases des NIH (Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um das Plasmid pbhPIV3, welches das Antigenom des in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten bovin-humanen Parainfluenzavirus Typ 3 unter Kontrolle des T7-Promotors kodiert und die drei Hilfsplasmide, welche die mRNAs der bPIV3-Proteine N, P und L unter Kontrolle des T7-Promotors exprimieren. Alle vier Plasmide tragen ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

Genomische DNA des *M. tb.*-Referenzstammes H37Rv wurde dankenswerter Weise von der Kinderklinik mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité, Klinik Heckeshorn zur Verfügung gestellt.

Die im Anhang ausführlich dargestellten Primer wurden von den Firmen TIBMolbiol und Oligoservice bezogen. Die oligo-dT-Primer wurden von TIBMolbiol bezogen.

3.5 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich (Steinheim), VWR (Darmstadt) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Steriles Verbrauchsmaterial wurde über das Lager der Charité Universitätsmedizin Berlin bezogen

und stammte von wechselnden Herstellern. Sterile Lösungen für die Zellkultur wurden von Biochrom (Berlin) und Cambrex (Verviers, Belgien) bezogen.

3.6 Antikörper

3.6.1 Erstantikörper

Eine Auflistung der verwendeten Erstantikörper sowie deren Hersteller und Verwendungszweck findet sich in Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Im Rahmen der Arbeit verwendete Erstantikörper

Antikörper/Antiserum (Spezies)	Firma/Institut (ID/Bestellnummer)	Anwendung (Verdünnung)
Antiserum gegen hPIV3 (Ziege)	US Biological, (Swampscott, USA) (P3107-27)	Anti-PIV3-Antikörper für die Plaque- Färbung (1:300)
Antiserum gegen hPIV3 (Ziege)	US Biological (P3107-27A)	Anti-PIV3-Antikörper für die Plaque- Färbung, HRP-konjugiert (1:300)
Anti-AG85A-Antikörper (Maus)	Max-Planck-Institut für Infektions- biologie, Berlin	Western-Blot (1:10.000)
Anti-Cfp10-Antikörper (Kaninchen)	Colorado State University (α -cfp10)	Western-Blot (1:10.000)
Anti-EGFP-Antikörper (Kaninchen)	Clontech (632377)	Western-Blot (1:4.000)
Anti-HspX-Antikörper (Maus)	Colorado State University (CS-49)	Western-Blot (1:100)
Anti-Mtb8.4-Antiserum (Kaninchen)	Labor Steven Reed, IDRI, Washigton, USA	Western-Blot (1:2.000)
Anti-Rv3407-Antiserum (Kaninchen)	Max-Planck-Institut für Infektions- biologie, Berlin	Western-Blot (1:1.000)

3.6.2 Zweitantikörper

Eine Auflistung der verwendeten Zweitantikörper sowie deren Hersteller und Verwendungszweck findet sich in Tabelle 3.2.

Tabelle 4.2: Im Rahmen der Arbeit verwendete Zweitantikörper

Antikörper/Antiserum (Spezies)	Firma/Institut (ID/Bestellnummer)	Anwendung (Verdünnung)
Anti-Maus-IgG-Antikörper	Pierce (31446)	Zweitantikörper für den Western-Blot (WB) gegen AG85A und HspX (1:20.000)
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Pierce (31458)	Zweitantikörper für den WB gegen Cfp10, Mtb8.4, Rv3407 und EGFP (1:10.000)
Anti-Ziege-IgG-Antikörper (Kaninchen)	Rockland, (Gilbertsville, USA) (# 605-4302)	Zweitantikörper für die Plaque-Färbung (1:300)

3.7 Puffer und Lösungen

Fertigpuffer und -lösungen wurden von unterschiedlichen Herstellern bezogen und unverändert eingesetzt. Diese Puffer sind im Rahmen der Beschreibung der einzelnen Methoden angegeben. Im Folgenden wird nur die Zusammensetzung selbst hergestellter Puffer und Lösungen beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um wässrige Lösungen.

CaCl ₂ -Lösung	60 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,6
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA
DNA-Ladungspuffer	4 g Sucrose und 2,5 mg Bromphenolblau in 10 ml TE-Puffer
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat pH 8,5, 1 mM EDTA
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 25 mg/l RNase A
Lysispuffer	2 N NaOH, 1 % SDS
Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat, pH 5,2
Zell-Lysispuffer	1 % Triton X-100 in PBS
Laufpuffer (Laemmli)	2,5 mM Tris pH 8,3, 19,2 mM Glycin, 0,01 % SDS
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8
Probenpuffer	125 mM Tris pH 6,8, 2% SDS
Blottingpuffer	1 Teil Laufpuffer (Laemmli), 2 Teile Methanol, 7 Teile H ₂ O
Blockierungslösung (Blot)	5 % Magermilchpulver in tTBS
tTBS	10 mM Tris-Base, 0,1 M NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5
Trypanblau-Lösung	0,5 % Trypanblau in PBS
Blockierungspuffer (Plaque)	5 % Magermilchpulver in 1xPBS (Biochrom)

3.8 Enzyme und Reagenzien

Die Typ II-Restriktionsenzyme, die T4-Ligase, die Exonuklease I und die *Antarctic Phosphatase* wurden zusammen mit den entsprechenden Enzympuffern von der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) bezogen. Die DNA-Polymerase *Ampli-Taq-Gold* und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Applied Biosystems (ABI, Weiterstadt) bezogen. Die *MLLV-Reverse Transkriptase* wurde zusammen mit den zugehörigen Puffern von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, ebenso wie das *Lipofectamine 2000*.

3.9 Kommerziell erworbene Kits und Assays

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurde mit verschiedenen fertig einsetzbar erworbenen Kits und Assays gearbeitet:

Das *QIAquick Gel Extraction Kit*, das *QIAfilter DNA-Maxi-Kit* und das *RNeasy Mini Kit* werden von der Firma Qiagen (Hilden) vertrieben. Das *Big Dye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* stammt von der Firma Applied Biosystems (ABI, Weiterstadt). Das *Pico Chemoluminescence Substrate Kit* der Firma Pierce (Rockford, USA) wurde zur Detektion im Rahmen des Western-Blots verwendet.

3.10 Medien

3.10.1 Zellkulturmedien

LLC-MK2-Zellen, BHK-Zellen und HEp2-Zellen wurden in EMEM (Biochrom, Berlin), supplementiert mit 5 % FCS (Biochrom), 4mM Glutamin (Biochrom) und 0,5 mg/ml Gentamicin (Ratiopharm, Ulm) kultiviert.

A549-Zellen wurden in DMEM/HAM'S F-12-Medium (Biochrom), supplementiert mit 10 % FCS (Biochrom) und 0,5 mg/ml Gentamicin (Ratiopharm) kultiviert.

Jurkat-Zellen und THP-1 Zellen wurden in RPMI-1640-Medium supplementiert mit 10 % FCS und Penicillin/Ampicillin kultiviert.

Das Overlay-Medium für die Plaquefärbung wurde hergestellt, indem zuerst für 500 ml Medium 25 g Methylzellulose zusammen mit einem Rührfisch in einer Glasflasche autoklaviert wurde, um anschließend mit sterilem LLC-MK2-Zellkulturmedium versetzt zu werden. Das Medium wurde drei Tage bei 4° C gerührt bis keine Methylzellulose mehr sichtbar war.

3.10.2 Flüssigmedien und Platten für die Kultivierung von Bakterien

LB-Medium besteht aus 1 % Bacto-Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v) und 1 % NaCl (w/v) in entionisiertem Wasser. LB-Agar-Platten benötigen den Zusatz von 1,5 % Agar zum LB-Medium vor dem Autoklavieren. LB-Selektionsmedium wurde durch Zugabe der Antibiotika Ampicillin (50 µg/ml Endkonzentration), Tetracyclin (10 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) zum Medium nach Abkühlen auf unter 50 °C hergestellt.

SOC-Medium besteht aus 2 % Bacto-Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 0,05 % NaCl (w/v), 0,02 % KCl (w/v) und 0,36 % Glukose (w/v) in entionisiertem Wasser.

3.11 Geräte

Neben den zur Laborgrundausrüstung gehörenden Geräten wurden verwendet:

Zwei Brutschränke (Heraeus 6000, Heraeus, Berlin und CB-150, Binder, Tuttlingen), ein Inkubator für Bakterien (TH-30, Bühler GmbH, Hechingen), ein Rotor-Stator-Homogenisator (Omni TH, Omnilab, Gainesville, USA), ein Fluorometer (Lambda Fluoro 320, MWG Biotech, Ebersberg), ein Durchflusscytometer (FACS-Calibur, BD Biosciences, Rockville, USA), ein PCR-Gerät (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf, Hamburg) und ein Spektrophotometer (Nanodrop-1000, Peqlab, Erlangen).

Weitere Geräte sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

3.12 Computerprogramme

Neben weit verbreiteten Programmen, welche zur Basisausstattung vieler Computer gehören, wie z.B. MS Office, kamen folgende, speziell für die naturwissenschaftliche Forschung entwickelte Programme zum Einsatz:

Bio-Edit, MacVector und DNASTAR wurden für Analyse, Vergleich und Verwaltung der DNA- und Protein-Sequenzen verwendet.

Das Programm Fast-PCR wurde für die Planung von PCR-Reaktionen verwendet, EnzymeX stellte eine erste Quelle für Informationen bezüglich der Restriktionsenzyme dar.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism verwendet.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Die Protokolle für die folgenden Methoden entstammen ursprünglich den beiden molekularbiologischen Standardwerken *Molecular Cloning* von Joseph Sambrook *et al.* [127] bzw. *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics* von Cornel Mühlhardt [128].

Sie wurden allerdings abgewandelt und den jeweiligen Bedingungen angepasst. Viele Modifikationen stammen aus Praktikumsprotokollen des Studienganges Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg, die von den jeweiligen Assistenten verfasst wurden.

4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

E. coli-Bakterien des Stammes XL-1 blue wurden auf einer mit Tetracyclin versetzten LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie in 3 ml mit Tetracyclin versetztes LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 200 U/min im Schüttelinkubator kultiviert. Am folgenden Tag wurden 200 µl der Suspension verwendet, um 20 ml mit Tetracyclin versetztes LB-Medium anzuimpfen. Bei Bedarf wurden mehrere Ansätze parallel bearbeitet, um die Zahl der am Ende entstehenden Aliquots zu erhöhen. Die Optische Dichte bei 600 nm (OD600) wurde im Folgenden in regelmäßigen Abständen gemessen, um die Bakterien bei einer OD600 von 0,3 in ihrer exponentiellen Wachstumsphase zu ernten. Dazu wurden die Bakterien auf Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und fünf Minuten auf Eis gekühlt, um anschließend bei 620 rcf (*relative centrifugal force*, Zentrifugalkraft relativ zur Erdanziehungskraft) für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert zu werden. Von diesem Schritt an wurde auf Eis und mit gekühlten Lösungen gearbeitet.

In einem sequentiellen Verfahren wurden nun, jeweils nach Verwerfen des Überstandes, die Bakterien erst in 8 ml, dann in 4 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen, 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert wie oben beschrieben. Zuletzt wurden aus 20 ml Suspension gewonnene Bakterien in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und 2 Stunden auf Eis inkubiert.

Die so hergestellte Suspension kompetenter Bakterien wurde entweder sofort verwendet, oder aber mit 15 % Glycerin versetzt, um anschließend in Aliquots à 100 µl bei -80 °C gelagert zu werden.

4.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die gefrorenen Aliquots der kompetenten Bakterien wurden ca. 15 Minuten auf nassem Eis gelagert, bis sie aufgetaut waren. Im Falle vorangegangener Ligationen wurden die 10 µl-Ansätze 1:10 mit sterilem TE-Puffer verdünnt und anschließend 20 µl des Ansatzes den Bakterien beigemischt. Sollten hingegen bereits vorliegende Plasmide retransformiert werden, so wurden 100 bis 500 ng Plasmid-DNA in 20 µl sterilem TE-Puffer zu den kompetenten Bakterien gegeben. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock in einem 42 °C heißen Schüttler, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden dem Ansatz 500 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Suspension bei 37 °C und 600 U/min auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde das gesamte Volumen unter Zuhilfenahme eines sterilen Drigalski-Spatels auf einer LB-Agar-Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.3 Bestimmung der Kompetenz der Bakterien

Zur Bestimmung der Kompetenz der Bakterien wurde eine Transformation mit einer Lösung des Plasmids pUC19 (0,01 µg/ml) wie oben beschrieben durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf der Platte gezählt und die Transformationskompetenz als Zahl der Bakterienkolonien pro µg Plasmid errechnet.

4.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Je nach Bedarf und Größe der zu schneidenden Nukleinsäuren wurden zwischen 200 ng und mehreren Mikrogramm DNA mit den Restriktionsendonukleasen des Typs II geschnitten. Die Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers (NEB) in einem Volumen zwischen 10 µl und 50 µl vereint, um zwischen 2 und 16 Stunden (für Vektorrestriktionen vor Ligationen, um den Hintergrund ungeschnittenen Vektors zu minimieren) bei den vom Hersteller (NEB) als optimal angegebenen Temperaturen verdaut zu werden.

4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die submarine, horizontale Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Auftrennung und zum Nachweis von DNA. Sie macht sich die negative Ladung von Nukleinsäuren zu Nutze, welche im elektrischen Feld zur Anode wandern. Agarose-Gele werden dazu waagrecht, von Puffer bedeckt zwischen zwei Elektroden fixiert. Da längere DNA-Fragmente aufgrund der engmaschigen Vernetzung der Agarose höheren Widerständen ausgesetzt sind, bewegen sich kürzere DNA-Fragmente schneller als längere und es kommt zu

einer Auftrennung der DNA nach ihrer Länge. Die Länge der DNA-Fragmente kann mit Hilfe eines Größenstandards bestimmt werden, der parallel zu den Proben aufgetragen wird.

Agarose-Gele wurden, je nach Länge der zu detektierenden DNA aus unterschiedlich hoch konzentrierten Lösungen von Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Dabei wurden Konzentrationen zwischen 0,7 % (w/v) und 3 % (w/v) verwendet.

Die TAE-Agarose-Suspension wurde in der Mikrowelle aufgeköcht bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurden 5 µl einer 0,1%igen Ethidiumbromid-Lösung hinzu gegeben und der Kolben kurz geschwenkt, bis die rote Färbung des Ethidiumbromids nicht mehr zu erkennen war. Die Agarose-Lösung wurde in den vorbereiteten Gelträger gegossen, wo sie erstarrte. Die Proben wurden mit einem Zehntel Volumen Glycerin-haltigem DNA-Ladungspuffer versetzt, welcher die Proben nicht nur farblich markierte, sondern auch in die Geltaschen absinken ließ. Die Elektrophorese in den unterschiedlichen Elektrophoresekammern fand bei 5 V/cm Elektrodenabstand statt. Sie wurde abgebrochen, wenn die fortgeschrittene Wanderung der durch den DNA-Ladungspuffer hervorgerufen blauen Farbbande auf eine ausreichende Auftrennung der auf dem Gel vermuteten DNA-Fragmente schließen ließ.

Die Gele wurden anschließend unter UV-Licht untersucht. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und verleiht diesen eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht, so dass DNA-Banden leicht detektierbar und im Falle präparativer Gele auch leicht auszuschneiden sind.

4.1.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Diente das Agarose-Gel zur Präparation spezifischer DNA-Fragmente, so wurden diese, nachdem sie mit UV-Licht detektiert worden waren, aus der Gel-Matrix ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers eluiert.

Die dafür durchgeführte Prozedur beinhaltete zuerst das Auflösen der aus dem Gel ausgeschnittenen, die DNA enthaltenden Agarosestücke in Gegenwart des chaotrophen Salzes Guanidiniumchlorid. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in einem dreifachen Volumen Puffer GC bei 50 °C für 10 Minuten inkubiert. Nachdem ein Gelvolumen Isopropanol zu der Lösung gegeben wurde, folgte eine übliche DNA-Aufreinigungsprozedur: Auf eine Bindung der DNA an eine Silica-Membran, erreicht durch Zentrifugation durch eine entsprechende Säule, folgte ein Waschschriff mit einem Puffer, dessen hoher Alkoholanteil eine Lösung der DNA verhinderte, während Salze ausgewaschen wurden. Anschließend konnte die DNA in Wasser gelöst werden. Abhängig von der Intensität der auf dem Gel detektierten Bande wurde in Volumina zwischen 30 µl und 100 µl eluiert.

4.1.7 Dephosphorylierung geschnittener Plasmid-DNA

Um während der Ligationsreaktion eine Religation der geschnittenen Plasmid-Enden zu vermeiden, wurden vor der Ligation die endständigen Phosphatreste der Plasmide entfernt. Dazu wurde nach Angabe des Herstellers (NEB) je μg zu dephosphorylierender Plasmid-DNA eine Enzymeinheit *antarctic phosphatase* (AP) und der dazugehörige Puffer eingesetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Enzym durch Erhitzen auf 80 °C für 10 Minuten inaktiviert. Der Ansatz der Dephosphorylierungsreaktion wurde generell dazu verwendet, um die Konzentration des geschnittenen Plasmids durch Verdünnung des Ansatzes mit entionisiertem Wasser auf 20 ng/ μl einzustellen.

4.1.8 Ligation von DNA

Geöffnetes und dephosphoryliertes Plasmid und Insert sollten mit Hilfe des Ligase-Enzyms des Bakteriophagen T4 zusammengefügt werden. Dafür wurden 40 ng Plasmid in 2 μl Volumen und entweder kompatibel geschnittenes oder - im Falle einer TA-Klonierung in pGEM-T - ungeschnittenes Insert im molekularen Verhältnis von 1:3 gemischt. Anschließend wurden 200 Enzymeinheiten T4-Polymerase und Puffer nach Angaben des Herstellers (NEB) hinzugegeben und die Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert.

4.1.9 Design von Primern

Wie bei allen Methoden, bei welchen Nukleotid- oder Protein-Sequenzen dargestellt oder editiert werden mussten, kam das Programm *BioEdit* zur Anwendung.

Die Primer wurden ohne technische Hilfe durch Computerprogramme direkt an der Sequenz entworfen. Beim Entwurf der Primer für die PCR wurden die Sequenzen nach folgenden Kriterien ausgewählt: Die Primer sollten zwischen 18 und 25 Basen lang sein und einen GC-Gehalt zwischen 40 % und 60 % aufweisen, der am 3'-Ende erhöht sein sollte, um eine Elongation durch die DNA-Polymerase zu vereinfachen.

Ausgewählte Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *FastPCR* überprüft und Sequenzen ausgewählt, deren Bewertung durch das Computerprogramm über einem Wert von 80 lag. Eine Übersicht der im Rahmen dieser Doktorarbeit entworfenen und verwendeten Primer findet sich im Anhang der vorliegenden Arbeit.

4.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde benötigt, um erstens die für die Klonierung notwendigen Inserts zu amplifizieren, um zweitens die Identität der Klone auf einer LB-Agar-

Platte zu überprüfen (*screen-PCR*) und um drittens die in der reversen Transkription der RNA erhaltene cDNA für die anschließende Sequenzierung zu amplifizieren.

4.1.10.1 Klonierungs-PCRs

Die Ansätze der PCR-Reaktionen für die Klonierung der zusätzlichen Gene waren sehr unterschiedlich. Generell wurde mit 10 µl-Ansätzen gearbeitet. Wurde jedoch festgestellt, dass die PCR-Effizienz gering war, wurde die Reaktion in größerem Maßstab wiederholt, um zu einer ausreichenden Menge DNA-Amplifikat zu gelangen.

Ein typischer 10 µl-Ansatz bestand aus 0,2 µl Polymerase-Enzym (Ampli-Taq Gold, ABI, entspricht einer Einheit (*unit*, U) enzymatischer Aktivität), 0,5 µl beider Primer in einer jeweiligen Konzentration von 10 µM, 0,5 µl dNTP-Mix (Konzentration aller vier Nukleotide jeweils 10mM, ABI) und 1 µl PCR-Puffer bereits von Herstellerseite versetzt mit 20 mM MgCl₂ (Ampli-Taq Gold, ABI). Als Matrize dienten entweder 50 ng Genom des *M. tb.*-Referenzstammes H37Rv oder aber des Plasmids pEGFP-N1. Zuletzt wurde mit entionisiertem Wasser (Sigma) auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Das PCR-Programm für die Amplifikation mit kurzen Primern, welche höchstens zwölf nicht paarende Nukleotide an ihrem 5'-Ende trugen, bestand üblicherweise aus einer fünfminütigen Aktivierungsphase der chemisch inaktivierten DNA-Polymerase bei 95 °C, gefolgt von 35 PCR-Zyklen aus 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 20 sec Anlagerung bei einer Temperatur, welche spezifisch für das Primerpaar war (üblicherweise 52 °C), gefolgt von einer einminütigen Amplifikation im enzymatischen Temperaturoptimum bei 72 °C. Nach den Zyklen wurden die Ansätze weitere 5 Minuten bei 72 °C inkubiert, um den letzten Syntheseschritt zu vervollständigen. Anschließend wurden die Reaktionen vom Gerät auf 4 °C gekühlt.

Für die langen Primer im Falle der Klonierung von Cfp10, AG85A oder EGFP wurde innerhalb der ersten 5 PCR-Zyklen eine Anlagerungstemperatur von 49 °C gewählt, um den Primern, bei denen die am 5'-Ende gelegenen 70 % der Nukleotide, aufgrund der dort integrierten viralen Genend-/Genstartsequenzen, nicht komplementär zur Basenfolge des Templates waren, in den ersten Zyklen eine bessere Anlagerung zu ermöglichen. Die folgenden 30 Zyklen konnten dann aufgrund dessen, dass die volle Primerlänge komplementär zum entstandenen Produkt war, mit wesentlich höheren Temperaturen durchgeführt werden. Insgesamt wurden diese Programme jedoch den einzelnen Bedingungen angepasst und entsprechend modifiziert.

4.1.10.2 Screen-PCRs

Im Gegensatz zu den Klonierungs-PCRs waren die *screen-PCRs* einheitlicher. Üblicherweise wurden pro LB-Agar-Platte zehn Kolonien überprüft.

Generell kamen für die Amplifikation Primer zum Einsatz, deren komplementäre Bindungssequenz auf dem Plasmid (pGEM-T oder aber pbhPIV3) lokalisiert war, und zwar zu beiden Seiten der Integrationsstelle. Im Falle des pbhPIV3 waren dies die Primer *pbh-r 15580* und *pbh-f 18470* (siehe Primerliste im Anhang). Im Falle des pGEM-T wurden T7-Primer und SP6-Primer verwendet, welche die auf dem Plasmid kodierten Promotoren dieser beiden RNA-Polymerasen binden. Hinzu traten Gen-spezifische Primer, mit deren Hilfe, kombiniert mit den Plasmid-spezifischen Primern, nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die Richtung der Integration des Genes überprüft werden kann.

Zuerst wurde ein *master-mix* hergestellt, welcher pro anzusetzender Reaktion 0,5 µl der beiden Primer (10 µM), 0,3 µl Ampli-Taq Gold (ABI), 1 µl Reaktionspuffer, versetzt mit 20 mM MgCl₂ (ABI), 0,5 µl dNTPs (jedes Nukleotid 10 mM) und 2,5 µl H₂O enthielt.

Dann wurden die Kolonien auf der Platte markiert und mit einer sterilen Pipettenspitze in 10 µl TE überführt. 5 µl der TE-Suspension wurden anschließend in einem 0,2 ml-PCR-Gefäß mit 5 µl *master-mix* vereinigt und der PCR-Amplifikation unterzogen.

Das Programm enthielt 10 Minuten Aktivierung bei 95 °C, 35 Zyklen aus 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Anlagerung bei 52 °C und 45 sec Amplifikation bei 72 °C. Anschließend wurde bei 72 °C für 5 Minuten inkubiert, um die Vollendung des letzten Syntheseschrittes sicherzustellen. Dann wurde die Reaktion im Block auf 4 °C abgekühlt. Eine Agarose-Gelelektrophorese brachte im Folgenden erste Hinweise über die Identität der untersuchten Kolonien.

4.1.10.3 PCR-Amplifikation zur anschließenden Sequenzierung

Die PCR-Amplifikation zur nachherigen direkten Sequenzierung betraf für die hier geschilderten Versuche ausschließlich die Überprüfung der Sequenzen der zusätzlich in die Viren eingebrachten Gene. Dafür wurden, wie in anderen Abschnitten detaillierter beschrieben, Zellen mit Viren infiziert, nach ungefähr 84 Stunden die RNA aus diesen gewonnen und aufgereinigt und anschließend mit Hilfe von oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben.

Die so gewonnene cDNA wurde mit Hilfe mRNA-spezifischer Primer amplifiziert. Das Programm entsprach dem für die Klonierung, jedoch wurde ein Ansatz von 20 µl gewählt, um mehr Amplifikat zu generieren.

4.1.11 Vorbereitung von PCR-Proben für die direkte Sequenzierung

Wurde die PCR durchgeführt, um das erhaltene Amplifikat anschließend zu sequenzieren, so wurde nach der PCR lediglich ein Drittel des Ansatzes auf das Agarosegel aufgetragen. War eine deutliche DNA-Bande der richtigen Länge zu erkennen, wurden die übrigen zwei Drittel des PCR-Ansatzes mit Exonuklease I versetzt, um mit dieser Einzelstrang-spezifischen Nuklease die Primer abzubauen. Außerdem wurden die im PCR-Ansatz befindlichen Nukleotide mit AP dephosphoryliert, um die Ratio aus Nukleotiden und Abbruch-Nukleotiden in der nachfolgenden Sequenzierungsreaktion nicht zu verändern. Die Ansätze bestanden aus 1 µl eines ExoI/AP-Gemisches pro 10 µl PCR-Reaktion, wobei das Gemisch aus je einem Teil Exonuklease I (NEB; 20 U/µl), einem Teil *antarctic phosphatase* (NEB, 5 U/µl) und zwei Teilen Wasser bestand. Die Ansätze wurden anschließend 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 75 °C für 30 Minuten.

4.1.12 Präparation von DNA aus Bakterienkulturen in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Die DNA-Präparation im kleinen Maßstab wird mit Hilfe alkalischer Lyse der Bakterien und anschließender Fällung der DNA in Ethanol durchgeführt. Es handelt sich dabei um die Standardmethode zur Aufreinigung von DNA, wie sie von mehreren Herstellern, ergänzt durch Zentrifugen-Röhrchen mit Silica-Membran zum Binden und Reinigen der DNA angeboten wird. Da im Rahmen dieser Arbeit die im kleinen Maßstab gewonnene DNA nicht besonders rein sein musste – für Klonierung und Sequenzierung sind leicht verunreinigte DNAs durchaus gut verwendbar – wurde die Präparation mit selbst hergestellten Puffern durchgeführt.

Über Nacht kultivierte Bakteriensuspensionen wurden entweder in 15 ml Falcon-Röhrchen oder aber in 2 ml Eppendorf-Gefäßen bei höchstmöglicher Zentrifugationsgeschwindigkeit für drei Minuten in der Tischzentrifuge pelletiert. Dann wurde das Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden 300 µl alkalischer Lysis-Puffer hinzu gegeben, das Gefäß kurz invertiert und für mindestens eine Minute, keinesfalls länger als drei Minuten, bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Unter Zugabe von 300 µl saurem Neutralisationspuffer wurde die Lyse schließlich durch Verschiebung des pH-Wertes in den neutralen Bereich abgebrochen und es wurde erneut zentrifugiert. 700 µl der über dem weißlichen, vor allem aus ausgefallenem Natriumdodecylsulfat (SDS) bestehenden Pellet befindlichen durchsichtigen Flüssigkeit wurden abgenommen und in mit 500 µl Isopropanol versehene Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden für mindestens eine halbe Stunde, bei

Bedarf auch mehrere Tage, bei -20 °C gelagert, anschließend wiederum durch Zentrifugation pelletiert wie oben beschrieben. Danach wurde der Überstand abgegossen, das Isopropanol mit 70%igen Ethanol ersetzt und wieder zentrifugiert. Nachdem das Ethanol abgegossen worden war, wurden die Pellets an der Luft getrocknet und üblicherweise in 50 µl entionisiertem Wasser (Sigma) aufgenommen.

4.1.13 Präparation von DNA aus Bakterienkulturen in großem Maßstab (Maxipräparation)

Bei der Wahl der Methode für Maxipräparationen ist der Verwendungszweck der DNA entscheidend. Sollte lediglich ein DNA-Vorrat eines Klonen zur Archivierung angelegt werden, oder handelte es sich bei dem Plasmid nur um einen Subklon, so wurde auf die oben beschriebene Methode zur Präparation von DNA in kleinem Maßstab zurückgegriffen und die Puffermengen entsprechend erhöht.

Für besonders reine DNA, wie sie für Transfektionen in eukaryotische Zellen benötigt wird und im Falle der Plasmide, welche das virale Antigenom enthalten und über 18 kB groß sind, wurde das *QIAfilter DNA Maxi Kit* (Qiagen) verwendet und nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Prinzipiell unterscheiden sich die Methoden jedoch wenig: Auch Qiagen verwendet die oben beschriebene alkalische Lyse für die Freisetzung der DNA aus den Bakterienzellen. Im Folgenden wurden jedoch die ausgefallenen Proteinbestandteile der Bakterien nicht durch Zentrifugation, sondern durch Filtration abgetrennt und die DNA, an eine Silica-Membran gebunden, über eine Säule gereinigt. Anschließend wurde die DNA mit entionisiertem Wasser eluiert und quantifiziert.

4.1.14 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung der DNA kamen zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Auf der einen Seite wurde DNA im Agarose-Gel optisch durch Vergleich der Intensität der zu bestimmenden DNA-Bande mit Marker-Banden bekannter DNA-Menge quantifiziert. Diese Methode ist nicht sehr genau, versetzt jedoch den Experimentator in die Lage, einen Näherungswert zu erhalten, wo die Quantifizierung mit Hilfe des Photometers nicht möglich ist, wie im Falle von PCR-Reaktionen oder unsauberen DNA-Aufreinigungen.

Die Methode der Wahl zur Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die Messung der Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge. Dafür wird im Nano-Drop-Photometer ein Spektrum über den Wellenlängenbereich zwischen 220 nm und 400 nm gemessen. Wurde ein deutliches Maximum bei 260 nm neben einem Absorptionsminimum bei 230 nm und einer

abfallenden Schulter bei 270 bis 320 nm beobachtet, wurde die DNA als sauber erachtet. In diesem Fall wurde die Absorption bei 260 nm in einem Lichtweg von 1 cm mit dem Faktor 50 multipliziert. Der Wert entsprach der DNA-Konzentration in ng/ μ l.

Für RNA-Proben gilt dasselbe Prinzip wie für die DNA-Quantifizierung. Agarose-Gele können Aufschluss über die Qualität der RNA geben, da bei ausreichender Menge die Banden der ribosomalen RNA deutlich sichtbar sein müssen. Bei der photometrischen Bestimmung muss mit einem Umrechnungsfaktor von 40 gerechnet werden, da RNA aufgrund der einzelsträngigen Struktur ein anderes Absorptionsverhalten aufweist.

4.1.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des *BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* der Firma ABI durchgeführt. Das Prinzip dieser Sequenzierung basiert auf dem Einbau fluoreszierender Abbruch-Nukleotide in den synthetisierten DNA-Strang.

Das DNA-Template war entweder ein Plasmid, von welchem 350 ng, im Falle der über 18 kb großen Plasmide, welche das Virusgenom kodierten, 500 ng verwendet wurden. Im Falle von Sequenzierungen aus PCR-Reaktionen wurden 5 μ l des vorbereitenden ExoI/AP-Ansatzes verwendet. Die Sequenzierungsansätze, deren Volumen am Ende mit entionisiertem Wasser auf 10 μ l aufgefüllt wurden, enthielten außerdem 1,5 μ l des Reaktionspuffers (ABI), 0,5 μ l des BigDye 3.1-Puffers (ABI) und 0,5 μ l des jeweiligen Sequenzierungsprimers (10 μ M).

Das Temperatur-Programm beinhaltete 1 Minute Aktivierung bei 96 °C, gefolgt von 42 Zyklen bestehend aus 15 sec Denaturierung bei 96 °C, 5 sec Anlagerung bei 52 °C und 4 Minuten Amplifikation bei 60 °C. Anschließend wurde der PCR-Block auf 4 °C abgekühlt.

Die Ansätze wurden mit 90 μ l eines 7:2-Gemisches aus Ethanol und H₂O versetzt und für 20 Minuten bei -20 °C gelagert. Dann wurden die Ansätze bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die PCR-Gefäße an der Luft getrocknet. Die Ansätze wurden in 30 μ l entionisiertem Wasser aufgenommen und von Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Genetik der Charité Berlin mit einem *ABI 3100 Sequencer* (ABI) analysiert. Die erhaltenen Sequenzen und vierfarbigen Abbildungen der Fluoreszenzintensitäten wurden mit verschiedenen Programmen analysiert: Kleinere Abschnitte wurden mit den Programmen *BioEdit* und *MacVector* bearbeitet. Im Falle von ganzen Virusgenomen wurde das *Assembling Tool* des Programms *DNASTAR* benutzt.

4.1.16 Isolation von RNA aus Kulturzellen

Zur Isolation der RNA aus Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen verwendet. Die Zellen wurden entweder mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst oder aber nach einmaligem Waschen mit PBS direkt in der Flasche lysiert. Dazu wurden 350 µl des Puffers RLT verwendet. Anschließend wurde die RNA den Herstellerangaben entsprechend mit Hilfe einer Silica-Membran gereinigt und in 40 µl entionisiertem Wasser eluiert. Die RNA wurde photometrisch vermessen und anschließend 1 µg RNA in die reverse Transkription eingesetzt.

4.1.17 Reverse Transkription von RNA

Während der Etablierung der reversen Transkription von RNA, die aus infizierten Zellen gewonnenen wurde, wurden sowohl die bekannten Klonierungsprimer als auch oligo-dT-Primer zur RNA-Umschrift verwendet. Dabei erbrachte die Verwendung von oligo-dT-Primern stabilere Ergebnisse.

1 µg RNA wurde in Ansätzen aus 2 µl oligo-dT-Primern (12-18 Nukleotide, 50 ng/µl), 2 µl dNTPs (jedes Nukleotid 10 mM) in einem Gesamtvolumen von 13 µl für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt. Dann wurden die Ansätze auf Eis gestellt um eine erneute Hybridisierung der RNA zu vermeiden. Es wurden anschließend 4 µl *First Strand Buffer* (Invitrogen) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Invitrogen) hinzugegeben und das Gemisch 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 1 µl Reverser Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV-RT, Invitrogen, 200 U/µl) wurde weitere 60 Minuten bei 37 °C umgeschrieben. Anschließend wurde das Enzym im Zuge einer 15-minütigen Inkubation bei 70 °C inaktiviert.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Lyse der virusinfizierten Zellen zum Proteinnachweis

Mit LLC-MK2-Zellen konfluent bewachsene 175 cm²-Zellkulturflaschen wurden mit rekombinanten Parainfluenzaviren infiziert. An Tag 4 nach der Infektion wurden die Zellen mit Zell-Lysispuffer versetzt, die Flüssigkeit kurz auf und ab pipettiert und das Lysat anschließend in Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80 °C eingefroren. Die vollständige Lyse der Zellen wurde am Lichtmikroskop überprüft.

4.2.2 Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein so genannter Bradford-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Verschiebung der Färbung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant blue* nach Anlagerung desselben an Proteine von 465 nm Wellenlänge hin zu

595 nm. Dafür wurden 10 µl der Lysate mit 490 µl physiologischer Kochsalzlösung versetzt und weitere 500 µl Bradford-Reagenz (Sigma) hinzu gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand eines mitgeführten Proteinstandards (BSA, Sigma) ermittelt.

4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Dabei wurden Trenngele mit Konzentrationen zwischen 10 % und 15 % Acrylamidgehalt mit 4,5%igen Sammelgelen überschichtet. Der niedrigere pH-Wert des Sammelgels erzeugt dabei andere Laufeigenschaften der in den Puffern enthaltenen Ionen. Durch die Entstehung eines Feldes zwischen den langsam und den schnell laufenden Ionen wird ein Konzentrationseffekt hervorgerufen, unter dessen Einfluss die in mehreren Millimeter Höhe aufgetragenen Protein-Proben auf eine scharfe Bande konzentriert werden.

Die eigentliche Auftrennung vollzieht sich hingegen im Trenngel. Nachdem sich das Natriumdodecylsulfat (SDS) mit seinem langen Dodecylschwanz aufgrund von aliphatischen Wechselwirkungen an die Protein angelagert und diese denaturiert hat, sorgen die negativ geladenen Sulfatgruppen für eine gleichmäßige, negative Oberflächenladung. Das Proteingemisch wandert deshalb im elektrischen Feld zur Anode und trennt sich ausschließlich aufgrund des durch die Proteingröße erzeugten Laufwiderstandes und nicht aufgrund der im Vergleich zur SDS-Wirkung kleinen Eigenladung der Proteine auf.

Für das Trenngel wurden 10 ml Trenngelpuffer, 400 µl SDS-Lösung (10 %), 20 µl TEMED (Sigma) und 200 µl APS (10 %, Sigma) mit einer von der gewünschten Konzentration abhängigen Menge Acrylamid:Bisacrylamid-Gemisch (37,5:1, Sigma) versetzt und der Ansatz mit Wasser auf 40 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde sofort zwischen die beiden das Gel formenden Glasplatten gegeben, mit ein wenig Wasser überschichtet und für ungefähr eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert, bis es ausgehärtet war. Anschließend wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel überschichtet.

Dessen Ansatz bestand aus 5 ml Sammelgel-Puffer, 200 µl SDS-Lösung (10 %), 8 µl TEMED (Sigma), und 100 µl APS (10 %, Sigma), 2 ml des Acrylamid:Bisacrylamid-Gemisches (37,5:1, Sigma) und 12,7 ml Wasser. In das Gel wurde ein Plastik-Kamm versenkt, um Taschen zu erhalten. Nach einer weiteren Stunde Lagerung bei Raumtemperatur konnte das Gel verwendet werden. Dafür wurde es in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und die beiden Tanks oberhalb und unterhalb des Gels mit Laufpuffer befüllt, so dass der

Stromkreis zwischen den beiden Elektroden geschlossen war.

Die Proben aus 25 µg Gesamtprotein in einem Volumen von 10 µl wurden mit weiteren 10 µl des DTT-haltigen Probenpuffers versetzt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Proben auf das Gel geladen. Zusätzlich wurden 10 µl eines eingefärbten Proteinmarkers in einer weiteren Tasche aufgetragen.

Der Beginn der Elektrophorese fand für 30 Minuten bei 20 mA statt, anschließend wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Wie im Falle des Agarose-Gels kann der Fortschritt der Auftrennung anhand des im Beladungspuffer enthaltenen Farbstoffes überprüft werden.

4.2.4 Western-Blot

Um die Proteine auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) zu übertragen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurde die PVDF-Membran zuerst für 15 sec in Methanol gelegt, um zu quellen, da sich PVDF ansonsten nicht mit wässrigen Flüssigkeiten benetzen lässt. Anschließend wurde die Membran in Wasser überführt, wo sie nun für zwei Minuten befeuchtet wurde.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 5 Minuten in Blotting-Puffer equilibriert. Ebenso wurde mit der benetzten Membran und den notwendigen Filterpapieren verfahren. Danach wurde der Blot zusammengesetzt, indem auf zwei Filterpapiere zuerst das Gel, dann die Membran und abschließend wieder zwei Filterpapiere gelegt wurden. Auf die Vermeidung von Luftblasen wurde dabei geachtet.

Der Blot wurde in einer Halterung fixiert und in eine Blotting-Puffer enthaltende Kammer getaucht. Dabei befindet sich die Anode auf Seiten der PVDF-Membran. Die Blotting-Prozedur fand für 2 Stunden bei 300 mA statt. Die Apparatur wurde währenddessen mit Wasser gekühlt und der Puffer mit Hilfe eines Rührers ständig durchmischt.

Nach dem Blotten wurde die Membran in Blockierungslösung überführt und über Nacht bei 4 °C die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Am nächsten Tag wurden die spezifischen Antikörper in Blockierungslösung verdünnt und die Membranen in einem Volumen von 10 ml für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit diesen inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit tTBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem entsprechend verdünnten passenden Zweitantikörper, analog jener mit dem Erstantikörper. Es schloss sich ein weiteres dreimaliges Waschen mit tTBS an.

Auf der so präparierten Membran wurden nun die Proteine mit Hilfe des *Pico Chemoluminescent Substrate Kits* (Pierce) nachgewiesen. Dazu wurden die Membranen entsprechend den Herstellerangaben mit 2 ml Reaktionsgemisch benetzt und in lichtdurchlässige Folie eingeschweißt. Das Reagenz wurde nach 5 Minuten entfernt. Dann

wurde auf der in der Folie verbliebenen Membran die Lichtreaktion mit Hilfe von Röntgenfilmen in der Dunkelkammer nachgewiesen. Die Banden des auf dem Blot sichtbaren Proteinmarkers wurden nachträglich auf dem Film markiert, um eine Größenabschätzung der sichtbaren Banden zu ermöglichen.

4.3 Zellbiologische und virologische Methoden

4.3.1 Kultur eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen bei 37 °C in speziellen Zellmedien im Brutschrank bei 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Für verschiedene Zelllinien wurden unterschiedliche Medien verwendet (siehe Material).

Zum Ablösen der konfluenten Kulturzellen wurden diese zuerst zweimal mit 37 °C warmem PBS-Puffer gewaschen, um anschließend mit einem Volumen von ungefähr 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom) pro 75 cm² Zellkulturfläche versetzt zu werden. Der Trypsinverdau wurde am Lichtmikroskop verfolgt und nach Ablösen der Zellen durch Zusatz von mit Serum versetztem Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend entweder aufgeteilt, eingefroren oder verworfen. Routinemäßig wurde in der Zellkultur auf eine Zählung der Zellen verzichtet und die Konzentration der Zellen zwischen unterschiedlichen Zellkulturgefäßen stattdessen über die Relation der Flächen zueinander bestimmt. Alle Zelllinien tolerierten außerdem eine hohe Bandbreite von Aussaatdichten, so dass sie je nach Bedarf zwischen der Hälfte und einem Dreißigstel der Zellen pro Flächeneinheit zur Weiterkultivierung verwendet wurden.

4.3.2 Zählen eukaryotischer Zellen

Zellen wurden für die Zählung gut suspendiert und im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau-Lösung versetzt. Anschließend wurden sie in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Aus statistischen Gründen wurden mindestens 150 Zellen gezählt in mindestens drei der vier Großquadrate.

4.3.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Um eukaryotische Zellen zu konservieren, können diese eingefroren und über Jahre bei gleich bleibender Viabilität in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die Zellen wurden dazu auf einer 175 cm²-Zellkulturflasche kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 75 % erreicht hatten. Nach Ablösen der Zellen durch Trypsin wurden diese mit Einfriermedium, bestehend aus 80 % Zellkulturmedium, 10 % zusätzlichem *fetal calf serum* (FCS) und 10 %

Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Eiskristallbildung verhindern sollte, vermischt. Dabei wurde die Konzentration so eingestellt, dass Aliquots à 1ml Einfriermedium 10^6 Zellen enthielten. Diese wurden anschließend in einem mit Isopropanol gefüllten Cryobehälter, welcher laut Herstellerangaben eine Abkühlungsrate von 1 °C pro Minute aufweist, bei -80 °C eingefroren. Innerhalb der folgenden Woche wurden die Cryobehälter in flüssigen Stickstoff transloziert.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen zunächst in der Hand angewärmt, um dann die Zellen bereits im Einfrierröhrchen in 37 °C warmem Medium aufzunehmen und in eine leere 25cm²-Zellkulturflasche zu überführen. Auf eine Zentrifugation, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO auswaschen zu können, wurde entgegen anders lautender Empfehlungen verzichtet, ohne dass dies negative Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen zeitigte. Der erste Medienwechsel nach Auftauen fand generell am folgenden Tag statt.

4.3.4 Virale Infektion von adhärenenten Kulturzellen

Bei vielen Methoden ist es wichtig, das Verhältnis von infektiösem Virus zu Zelle während der Infektion genau festzulegen. Dies gilt vor allem für quantitative Methoden, wie die weiter unten beschriebene Wachstumskurve. Im Falle von qualitativen Methoden, wie den Nachweis von Viren exprimierter Antigene, kann hingegen auf eine genaue Bestimmung der Zellzahl verzichtet werden, und es können stattdessen Erfahrungswerte bezüglich der Zellzahl angenommen werden. Um Zellkulturgefäße mit Virus zu infizieren, wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch ein Volumen Virussuspension, welches ca. 0,05 ml pro cm² Zellkulturfläche entsprach, ersetzt. Die Zellen wurden anschließend auf einem Schüttler geschwenkt, so dass der Zellrasen nicht trocken fiel. Nach ungefähr 2 Stunden wurde die Virussuspension wieder abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Kultivierung infizierter Zellkulturen fand im Gegensatz zu nicht infizierten Kulturzellen bei 32 °C statt.

4.3.5 Virale Infektion von Suspensionszellkulturen

Suspensionszellen, im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten betrifft dies Jurkat- und THP1-Zellen, wurden bei 600 rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgossen und die Zellen in PBS suspendiert, und die Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dann wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und anschließend in 2 ml Virussuspension aufgenommen, welche vorher entsprechend des gewünschten Virus-Zell-Verhältnisses verdünnt worden war. Die Suspension wurde anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem rotierenden Gestell inkubiert, so dass

es zu einer ständigen Durchmischung von Zellen und Viren kam. Nach 2 Stunden wurden die Zellen wieder zentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium aufgenommen, um bei 32 °C kultiviert zu werden.

4.3.6 Vermehrung von Viren

4.3.6.1 Vermehrung von Parainfluenzaviren

175 cm²-Zellkulturflaschen wurden in einem Virus-Zell-Verhältnis (*multiplicity of infection*, MOI) von 0,1 bis 1 infiziert. Sobald ein deutlicher cytopathischer Effekt zu beobachten war, meist drei oder vier Tage nach der Infektion, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rcf zentrifugiert, um abgeschwommene Zellen und Zelltrümmer aus der Virussuspension zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.3.6.2 Vermehrung von MVA-T7

MVA-T7 wurde durch Passagierung in BHK-Zellen vermehrt. Das Vorgehen war analog zur Vermehrung der Parainfluenzaviren, mit der Abweichung, dass der cytopathische Effekt schneller und deutlicher eintrat, als bei den Parainfluenzaviren. Deshalb wurden die Viren bereits an Tag 2 nach der Infektion geerntet.

4.3.7 Titration von Viren mit Hilfe der TCID₅₀

Das Prinzip der *tissue culture infectious dose 50%* (TCID₅₀)-Titration beruht darauf, infektiöses Virus durch serielle Verdünnungen zu vereinzeln. Die unterschiedlichen Verdünnungen des Virus werden anschließend verwendet, um jeweils mehrere Vertiefungen einer Zellkulturplatte zu infizieren. In niedrigen Verdünnungen ist dabei zu erwarten, dass sich in allen mit der gleichen Verdünnung infizierten Vertiefungen nach einer ausreichend langen Infektionszeit das Virus nachweisen lässt, in den höchsten Verdünnungen hingegen sollte keine Infektion nachweisbar sein. Die Nachweismethode ist dabei vom jeweiligen Virus abhängig. Der Titer bestimmt sich als der Übergang von den infektiösen zu den nicht-infektiösen Verdünnungen. Jene Verdünnung, bei welcher gerade die Hälfte der infizierten Vertiefungen im Virusnachweis positiv ist, wird als TCID₅₀ ausgelesen und der Titer als TCID₅₀/ml angegeben.

4.3.7.1 Titration von MVA-T7 mit Hilfe der TCID₅₀

Die Titration des MVA-T7 wurde ausschließlich mit Hilfe einer TCID₅₀ durchgeführt. Mit BHK-Zellen zu 70%iger Konfluenz bewachsene 96well-Platten wurden mit in

Zweierschritten absteigenden Verdünnungen der MVA-T7-Virussuspension versetzt, wobei jeweils vier Vertiefungen mit derselben Verdünnung angesetzt wurden. Aufgrund des hohen cytopathischen Effektes konnte an Tag 3 nach der Infektion der Titer ohne weiteren Nachweis am Lichtmikroskop bestimmt werden.

4.3.7.2 Titration rekombinanter Parainfluenzaviren mit Hilfe der TCID₅₀

Auch für rekombinante Parainfluenzaviren wurde eine Titration mit Hilfe der TCID₅₀ versucht. Dabei wurden 96well-Platten mit LLC-MK2-Zellen angesetzt und infiziert, wenn die Konfluenz bei ca. 50 % lag. Nach dreitägiger Infektion wurde der Assay durchgeführt. Um infizierte von uninfizierten Vertiefungen unterscheiden zu können, wurden diese mit einer 1%igen Lösung von Erythrocyten des Meerschweinchens oder von Menschen mit Blutgruppe 0 in PBS inkubiert. Diese werden vom HN-Protein des Parainfluenzavirus Typ 3 gebunden, so dass sich um Virus-infizierte Zellen, auf deren Oberfläche die viralen Oberflächenproteine im Verlauf der Infektion akkumulieren, eine Corona aus Erythrocyten bildet. So können prinzipiell von Parainfluenzaviren erfolgreich infizierte Zellen von nicht-infizierten unterschieden werden. Beim Auslesen der Titer sollten jene Vertiefungen als positiv angesehen werden, in denen sich nach dreimaligem Waschen mit PBS weiterhin Zellen befanden, welche von Erythrocyten umgeben waren.

4.3.8 Titration mit Hilfe eines Plaque-Tests

Die Virustitration mittels Plaque-Tests entstand historisch in Anlehnung an die bakterielle Titration, in deren Rahmen Kolonien auf Kulturplatten mit festem Medium ausgezählt werden. Um diesen Effekt für in Zellkulturen wachsende Viren herstellen zu können, muss eine Ausbreitung der Viren über das Zellkulturmedium unterbunden werden. Dieses wird zu diesem Zweck mit Agar verfestigt oder mit Methylcellulose eingedickt. Anschließend können sich die Viren nur noch zwischen direkt benachbarten ausbreiten. Eine Ansammlung von infizierten Zellen kann dann entweder als *Plaque* genanntes Loch im dichten Zellrasen identifiziert werden oder aber mit Hilfe von Färbungstechniken nachgewiesen werden. Anschließend könne die Plaques gezählt und der Virustiter somit unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte in *plaque forming unit* (pfu) pro Volumeneinheit bestimmt werden.

4.3.8.1 Titration rekombinanter Parainfluenzaviren mit Hilfe eines Plaque-Tests

Plaque-Färbungen wurden auf konfluent mit LLC-MK2-Zellen bewachsenen 6well-Platten durchgeführt. Die zu titrierende Virussuspension wurde dazu seriell dekadisch verdünnt und

anschließend ein Volumen von 500 µl der Verdünnungen in je eine Vertiefung gegeben. Nach zweistündiger Infektionszeit wurde das Inokulum abgenommen und durch je 3 ml mit Methylzellulose versetztem Overlay-Medium hoher Viskosität ersetzt. Nach achttägiger Inkubation bei 32 °C wurden die Zellen zunächst mit 3 ml/Vertiefung eiskaltem 80%igem Methanol fixiert, wobei der Alkohol vorsichtig auf das Overlay gegeben wurde. Anschließend wurden Overlay und Methanol ausgeschlagen und durch weitere 3 ml 80 % Methanol ersetzt. Nach weiteren 30 Minuten bei 4 °C wurde das Methanol abgenommen, einmal mit Blockierungspuffer gespült und anschließend unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit 3 ml Blockierungspuffer bei 4 °C abgesättigt. Anschließend folgte die eigentliche Plaquefärbung, für welche zwei verschiedene Protokolle etabliert wurden:

Zum einen wurde eine Färbung in einem Schritt mit Hilfe eines direkt mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugierten anti-PIV3-Antikörper aus der Ziege (US Biological) durchgeführt. Zum anderen wurde mit dem gleichen Antikörper ohne Modifikation gearbeitet, der anschließend mit Hilfe eines Zweitantikörpers aus der Maus, welcher spezifisch die Ziegen-Antikörper band und HRP-konjugiert war, nachgewiesen werden musste. Alle Antikörper wurden 1:300 in Blockierungspuffer verdünnt. Es wurde ein Volumen von 400 µl pro Vertiefung eingesetzt und die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur mechanisch leicht geschwenkt, so dass der Zellrasen nicht trocken fiel. An die Inkubation mit Antikörpern schloss sich jeweils ein dreimaliges Waschen mit PBS an.

Die HRP-konjugierten Antikörper konnten anschließend mittels einer Farbreaktion mit 4-Chloro-1-Naphtol nachgewiesen werden. Dazu wurden pro Vertiefung 500 µl eines Zwei-Komponenten-Systems (KPL) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach 10 Minuten waren die Plaques gut sichtbar und konnten ohne Hilfe eines Mikroskops vor hellem Hintergrund gezählt werden.

4.3.9 Herstellung rekombinanter Parainfluenzaviren

Zur Herstellung rekombinanter Parainfluenzaviren wurden Plasmide, die das Antigenom des zu erzeugenden Virus und die mRNA der Hilfsproteine jeweils unter Kontrolle des T7-Promotors kodieren, in HEp2-Zellen transfiziert. Anschließend wurde die Zellkultur mit MVA-T7 infiziert.

Am Tag vor der Herstellung der Viren wurden Platten mit Hep2-Zellen angesetzt, so dass diese am Tag des Experiments zu 90 % konfluent waren.

Zuerst wurde ein *master-mix* der drei Hilfsplasmide pTM(N), pTM(P) und pTM(L) hergestellt. Dieser enthielt für jede im Folgenden verwendete Vertiefung 0,2 µg pTM(N),

0,2 µg pTM(P) und 0,1 µg pTM(L). Nach gutem Durchmischen wurde der Mix auf Eppendorfgefäße verteilt. Anschließend wurde für jedes zu erzeugende Virus in zwei Eppendorfgefäße 5 µg von dem das Antigenom kodierenden Plasmid gegeben.

Anschließend wurden für jedes Eppendorf-Gefäß 15 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) mit 185 µl OptiMEM-Medium ohne Serum gemischt und zügig 200 µl dieser Suspension in die Eppendorfgefäße gegeben. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde das MVA-T7 aufgetaut und mit OptiMEM-Medium, welchem 10 % FCS zugesetzt waren, in einem 15 ml-Gefäß so verdünnt, dass in 800 µl Lösung $2,5 \times 10^7$ TCID₅₀ enthielten. Dieses Gefäß wurde in einem Wasserbad, in welches ein Ultraschallstab versenkt war, 5 Mal für je eine Sekunde beschallt, um ein eventuelles Verkleben der Viren untereinander aufzuheben. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden je 800 µl der Virussuspension zu den Lipofectamine/Plasmid-Gemischen in den Eppendorfgefäßen gegeben, und dann das Gesamtvolumen von 1 ml auf eine zuvor vom Zellkulturmedium befreite, Vertiefungen einer Zellkulturplatte gegeben. Obwohl für jedes herzustellende Virus lediglich zwei Vertiefungen Verwendung fanden, wurde für jedes Virus eine separate 6well-Platte benutzt, um die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzkontamination zwischen parallel hergestellten rekombinanten Viren zu minimieren.

Die Platten wurden über Nacht bei 32 °C inkubiert. Nach 12 Stunden wurde der Überstand gegen 3 ml HEP2-Kulturmedium ausgetauscht. Nach 3 Tagen wurde dieses wiederum verwendet, um LLC-MK2-Zellen mit dem entstandenen Virus zu infizieren. Nach der zweiten LLC-MK2-Passage wurden erste Aliquots bei -80 °C eingefroren.

4.3.10 Bestimmung einer Wachstumskurve

Um die multizyklische Replikation unterschiedlicher Viren in Zellkultur zu vergleichen, wurden konfluent mit LLC-MK2-Zellen bewachsene Vertiefungen einer 6well-Platte mit einer bestimmten Anzahl der jeweiligen Viren infiziert und im Folgenden alle 24 Stunden eine Probe des Zellkulturüberstandes entnommen und für eine spätere Titration bei -80 °C eingefroren.

Dazu wurde am Tag vor der Infektion pro zu untersuchendem Virus eine 6well-Platte mit LLC-MK2-Zellen ausgehend von konfluenten Zellkulturflaschen 1:2 verdünnt angesetzt. Am Tag der Infektion wurden in je zwei der Vertiefungen die Zellen durch Trypsin abgelöst und die enthaltenen Zellen gezählt. Anschließend wurden je zwei Vertiefungen mit einer MOI von 0,01 mit jedem der zu untersuchenden Viren infiziert. Nach der zweistündigen Inkubation auf dem Schüttler wurde das Inokulum durch 3 ml Zellkulturmedium ersetzt und die infizierten

Zellen bei 32 °C und 5 % CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert. An den folgenden 6 Tagen wurde jeweils im Abstand von 24 Stunden 1 ml des Zellkulturüberstandes abgenommen und in zwei Aliquots à 500µl sofort bei -80 °C eingefroren. Das Medium wurde ersetzt und die Platten wie zuvor weiter kultiviert.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde je ein Aliquot aller Proben mit Hilfe eines Plaque-Tests titriert. Wichen die für die beiden Vertiefungen erhaltenen Werte stark voneinander ab, wurde das zweite Aliquot beider Vertiefungen ebenfalls titriert. In der Zusammenschau der Werte konnten so gegebenenfalls statistische Ausreißer erkannt und ein Mittelwert der validen Titer gebildet werden.

4.3.11 Nachweis der erfolgreichen Infektion durch bhPIV3-EGFP mittels Durchflußcytometer

Mit bhPIV3-EGFP infizierte Zellen wurden an Tag 3 nach der Infektion mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, bei 600 rcf und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in PBS aufgenommen und einer FACS-Messung in einem *FACS-Calibur*-Gerät (BD-Biosciences) unterzogen. Nach Anregung der Fluoreszenz mit Laserlicht der Wellenlänge 484 nm wurde, neben dem Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC) und dem Seitwärtstreulicht (*sideward scatter*, SSC), die Fluoreszenz bei 530±30 nm bestimmt.

4.3.12 Bestimmung der EGFP-Expression durch Messung der Fluoreszenzentwicklung im Fluorometer

Aus den Vertiefungen einer 96well-Platte wurde das Kulturmedium entfernt und anschließend 100µl eines Lysispuffers aus 1 % Triton X-100 in PBS hinzugegeben. Anschließend wurden die Platten kurz geschwenkt und mit Folie versiegelt bevor sie von außen desinfiziert wurden. Zum Auslesen der Fluoreszenzintensität wurden die Proben im Fluorometer mit Licht der Wellenlänge 485±12,5 nm angeregt, und die Emission bei einer Wellenlänge von 520±10 nm gemessen. Sowohl Anregung und Messung wurden im Gerät aus einer Position unterhalb der Platte vorgenommen.

4.4 Tierexperimentelle Methoden

Die *in-vivo*-Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Viren wurden in zwei unabhängigen Tierversuchen überprüft.

Zum einen wurden Baumwollratten mit drei verschiedenen Viren oder als Kontrolle mit Medium infiziert. Zum anderen wurden Mäuse mit den *M. tb.*-Antigene exprimierenden

rekombinanten Parainfluenzaviren infiziert, gefolgt von einer *M. tb.*-Infektion der Tiere, um den Schutzeffekt der parainfluenzaviralen Impfung zu überprüfen.

4.4.1 Tierexperimentelle Arbeiten mit Baumwollratten

Die Arbeiten mit Baumwollratten wurden in Räumen der *Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin* (FEM) der Charité Berlin durchgeführt. Sie fanden unter BSL-2-Bedingungen statt. Die Tiere wurden zu zweit oder zu dritt in Mikroisolatorkäfigen des Typs III (810 cm² Grundfläche) gehalten. Die Haltung erfolgte bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Nahrung und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

4.4.1.1 Sedierung und Analgesierung der Baumwollratten

Da es sich bei Baumwollratten um sehr aktive und bissige Tiere handelt, die sich nicht in der Hand halten lassen, mussten die Tiere in einem sequenziellen Verfahren betäubt werden. Zuerst wurden die Tiere in den Käfigen in Isofluran-Atmosphäre kurz betäubt. Anschließend konnten sie dann mit der Hand positioniert und durch intramuskuläre Gabe eines Gemischs aus 45 mg/kg Ketamin (Ketavet) und 18 mg/kg Xylazin (Rompun) narkotisiert werden. Die auf diese Art hervorgerufene Analgosedierung dauerte ungefähr eine halbe Stunde.

4.4.1.2 Infektion von Baumwollratten mit rekombinanten Parainfluenzaviren

Die Infektion der Baumwollratten erfolgte durch intranasale Inokulation von Virussuspensionen. Die unterschiedlichen Viren, deren Titer zuvor mittels Plaque-Test bestimmt worden war, wurden zunächst aus dem -80 °C-Schrank entnommen und bis zum Einsatz auf nassem Eis gelagert. Kurz vor der Infektion der ersten Tiere wurden die Röhrchen in der Hand erwärmt, bis das Eis komplett geschmolzen war. Anschließend wurde die Konzentration aller Viren mit Hilfe von Zellkulturmedium auf einen Titer von 5×10^6 pfu/ml eingestellt. Die narkotisierten Tiere erhielten nun 100 µl der Suspension. Dabei wurden mit einer Pipette zuerst pro Nasenloch 25 µl gegeben, bevor nach einer dreiminütigen Pause die zweite Hälfte der Infektionsdosis verabreicht wurde.

4.4.1.3 Tötung der Tiere und Präparation der Organe

Die Tiere wurden entsprechend dem oben angegebenen Vorgehen betäubt. Anschließend wurden sie durch Dekapitierung getötet und das an der Schnittstelle austretende Blut in einem zuvor mit 1 ml PBS versehenen sterilen Becher aufgefangen. Das Blut wurde sofort mit einer Spritze in ein mit Heparin beschichtetes Röhrchen überführt, durch Schütteln gemischt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden Brust- und Bauchraum des Tieres geöffnet und Milz

und Lunge entnommen. Die Milz wurde in einem sterilen Röhrchen auf Eis gelagert. Die Lunge wurde nach Entnahme geteilt. Dabei wurden zwei Lappen der rechten Lungenhälfte in Rundboden-Röhrchen gegeben, deren Gewicht vorher bestimmt worden war und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die restliche Lunge wurde für Folgeversuche in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Es schloss sich eine Homogenisierung der Lungen und ein Auftrennen des Blutes an, wie sie im Abschnitt 4.5 beschrieben werden.

4.4.2 Tierexperimentelle Arbeiten mit Mäusen

Die in dieser Arbeit beschriebenen tierexperimentellen Arbeiten mit Mäusen fanden im MPI für Infektionsbiologie in Berlin statt. Arbeiten mit *M. tb.* finden unter BSL 3-Bedingungen statt. Aus diesem Grund war es mir nicht möglich, die im Folgenden beschriebenen Methoden allein und ohne Hilfe durchzuführen. Dies betrifft vor allem die BCG-Immunisierung (4.4.1.1), die Infektion der Tiere mit *M. tb.* (4.4.1.3) und das Töten und Präparieren der Organe der Tiere (4.4.1.4). Die Infektion der Tiere mit *M. tb.* und das Auslesen der bakteriellen Titer wurden von Mitarbeitern der MPI durchgeführt.

4.4.2.1 Injektion von BCG

Die Tiere wurden in einem oben geschlitzten Metall-Trichter fixiert und 5×10^5 colony forming units (cfu) BCG Pasteur in 100 µl Kochsalzlösung in eine der Hinterpfoten gespritzt.

4.4.2.2 Sedierung und Infektion mit rekombinanten Parainfluenzaviren

Die Mäuse wurden ähnlich den Baumwollratten mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin betäubt. Anschließend wurden sie mit 8×10^5 pfu der parainfluenzaviralen Impfvektoren in 80 µl Virussuspension intranasal immunisiert. Um die Tiere zu schonen, wurden, unterbrochen von einer kurzen Pause, zwei Mal 40 µl der Flüssigkeit gegeben und die Tiere anschließend unter Infrarot-Licht gewärmt, bis die Narkose abgeklungen war.

4.4.2.3 Infektion der Tiere mit *M.tuberculosis*

Die Mäuse der einzelnen Gruppen wurden mit wasserfesten Stiften farblich markiert und anschließend in Metallkäfigen in einen *Middlebrook Airborne Infection Apparatus* (Middlebrook, USA) gesetzt. Während der folgenden Stunde waren die Tiere mit Mykobakterien versetzter Luft ausgesetzt, wobei die Bakterien-Last in der Atemluft der Zieldosis von 100 Bakterien pro Tier entsprechend kalkuliert war.

4.4.2.4 Töten der Tiere und Präparation der Organe

Tiere wurden zu drei bestimmten Zwecken getötet:

Erstens zur Überprüfung des Viruswachstums in der Lunge der Mäuse. Dazu wurden an den Tagen 2, 4 und 7 nach der Infektion jeweils 5 Tiere der beiden Gruppen, welche bhPIV3 ohne Insert oder aber bhPIV3-RV3407 erhalten hatten, durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde die Lunge entnommen und auf Eis gelagert, um später in Räumlichkeiten der Charité homogenisiert zu werden, damit anschließend der Virustiter bestimmt werden konnte.

Des Weiteren wurden fünf nicht immunisierte Tiere an Tag 1 nach der *M. tb.*-Infektion getötet, um die tatsächliche Bakterienaufnahme während der Infektion zu bestimmen. Das Vorgehen entsprach der im Folgenden beschriebenen Bestimmung der Titer am Ende des Gesamtversuches.

Schließlich wurden an Tag 42 nach der Infektion die Tiere aller Versuchsgruppen getötet, um die Bakterienlast in Lunge und Milz bestimmen zu können und weitere immunologische Parameter auslesen zu können. Dazu wurden die Tiere durch Genickbruch getötet, die Bauchhöhle eröffnet und die Bauchorta durchtrennt, so dass das Blut sich in der Bauchhöhle sammelte. Blut wurde mit einer Pipette entnommen, und in einem Röhrchen gelagert, wo es koagulierte. Anschließend wurde die Brusthöhle geöffnet und Lunge und Milz entnommen. Jeweils eine halbe Lunge wurde geteilt und eingefroren, um histologische und quantitative Analysen (*real-time* RT-PCR) zu einem späteren Zeitpunkt zu ermöglichen. Die andere Hälfte der Lunge und die Milz wurden zur Bestimmung der Bakterienlast homogenisiert. Bei diesen Arbeiten wurde streng darauf geachtet, keine Aerosole zu erzeugen. Zur Homogenisierung wurde deshalb auf technische Geräte verzichtet und die Organe nach Entnahme in einem geschlossenen Beutel in 1 ml PBS mit Hilfe eines mit Wasser befüllten 50 ml-Falcon-Röhrchens zerdrückt. Anschließend wurden serielle Verdünnungen in Zehnerschritten hergestellt und 50 µl der Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁴ auf jeweils einer halben Selektionsplatte ausgestrichen. Nach dreiwöchiger Inkubation wurden die Bakterienkolonien gezählt und ausgewertet. Aufgrund dessen, dass lediglich 50 µl von 1 ml Suspension verwendet wurden, entsteht für die Milz ein Verdünnungsfaktor von 20, im Falle der Lunge tritt hinzu, dass nur das halbe Organ verwendet wurde. Der Verdünnungsfaktor liegt hier bei 40. Da die unverdünnte Suspension nicht ausplattiert wurde, sondern die 1:10-Verdünnung die höchstkonzentrierte Bakteriensuspension darstellt, konnten lediglich Bakterientiter von über 200 cfu bzw. 400 cfu pro Organ quantifiziert werden.

4.5 Bestimmung der viralen Replikation

4.5.1 Bestimmung der Viruslast in der Lunge der Versuchstiere

Zur Bestimmung der Viruslast in der Lunge wurden die Organe gewogen, je nach Gewicht zwischen 1:10 nur 1:40 mit Zellkultur-Medium versetzt, so dass mindestens 1,5 ml Gesamtvolumen resultierten und mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Omnilab) zerkleinert. Das Homogenisat wurde anschließend für 5 Minuten bei 2000 rcf zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Je nach Erwartung der Höhe des Virustiters wurden Verdünnungen des Überstandes hergestellt und entsprechend der oben angegebenen Methode mit Hilfe der Plaque-Färbung titriert. Überschüssiges Homogenisat wurde bei -80 °C eingefroren, um weitere Untersuchungen durchführen zu können.

4.6 Bestimmung neutralisierender Antikörper

4.6.1 Bestimmung des Titers neutralisierender Antikörper

Für die Bestimmung des Neutralisationstiters wurde zuerst Serum aus dem Blut der Baumwollratten gewonnen. Dazu wurde das Röhrchen mit dem bereits vorher verdünnten Blut gewogen und weiteres PBS hinzu gegeben, so dass eine Gesamtverdünnung von einem Teil Blut zu zwei Teilen PBS entstand.

Das verdünnte Blut wurde anschließend auf Ficoll-Lösung der Dichte 1,077 g/ml aufgetragen, so dass ein diskontinuierlicher Gradient entstand. Danach wurde für 20 min bei 620 rcf bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei die Bremse der Zentrifuge inaktiviert war. Das Serum wurde abgenommen und für die spätere Bestimmung der Antikörpertiter eingefroren. Die mononukleären Blutzellen aus der Interphase wurden separat abgenommen und für andere Versuche eingesetzt.

4.6.1.1 Bestimmung des Neutralisationstiters mit Hilfe des Plaque-Reduktions-Neutralisationstests (PRNT)

Der PRNT wurde auf konfluent mit LLC-MK2-Platten bewachsenen 24well-Platten durchgeführt. Dafür wurden die Zellen am Tag vor der Infektion ausgesät und über die Fläche berechnet 1:2 verdünnt angesetzt. Durch sorgfältiges Schwenken der Platten wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sichergestellt.

Die für den Neutralisationstest notwendigen seriellen Serum-Verdünnungen wurden im Vorfeld auf 96well-ELISA-Platten angesetzt. Es wurden pro Probe zehn Serum-Verdünnungen in Zweierschritten angesetzt, die einen Konzentrationsbereich von 1:2 bis

1:1024 überstrichen, gefolgt von jeweils zwei Negativkontrollen ohne Serumzusatz.

Den einzelnen Verdünnungen wurden nun jeweils gleich viele infektiöse Viren zugesetzt. Dazu wurde ein Aliquot des zu neutralisierenden PIV3 aufgetaut und mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1330 pfu/ml verdünnt, wobei für jede zu bestimmende Probe 1,2 ml Virus benötigt wurden. Von dieser Suspension wurden anschließend 100 µl - also 133 pfu - auf die einzelnen mit den Verdünnungen versehenen Vertiefungen gegeben und so mit jeweils 100 µl der Proben vereint. Es folgte eine halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden je 75 µl der Suspensionen auf die einzelnen Vertiefungen der mit LLC-MK2-Zellen bewachsenen 24well-Zellkulturplatten gegeben. Ohne Neutralisation wären also ungefähr 50 Plaques pro Vertiefung zu erwarten gewesen. Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bewegt. Dann wurde das Virus-Inokulum entfernt und durch 500 µl Overlay-Medium ersetzt. Nach sechs Tagen wurde eine Plaque-Färbung nach dem oben angegebenen Protokoll durchgeführt (4.3.8.1), wobei die dafür eingesetzten Volumina der unterschiedlichen Puffer und Lösungen entsprechend des Flächenverhältnisses zwischen 6well- und 24well-Platten ein Fünftel der angegebenen Mengen betragen.

4.6.1.2 Bestimmung des Neutralisationstiters mit Hilfe des Fluoreszenz-Reduktions-Neutralisationstests (FRNT)

Der FRNT folgt demselben Prinzip wie der oben vorgestellte PRNT: Serielle Verdünnungen der zu bestimmenden Proben werden mit einer definierten Dosis Virus vereinigt und die resultierende Neutralisation als geringeres Virus-Wachstum in den Neutralisationsansätzen im Vergleich zu nicht neutralisierten Ansätzen gemessen.

Im Gegensatz zum PRNT kann beim FRNT jedoch auf eine Plaque-Färbung verzichtet werden, da statt des PIV3 das bhPIV3-EGFP als zu neutralisierendes Virus verwendet wird. Die Replikation des bhPIV3-EGFP lässt sich leicht anhand der Zunahme der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmen.

Der Ansatz der LLC-MK2-Zellen erfolgte auf 96well-Platten. Für je zwei Proben wurde eine 96well-Platte benötigt. Die Zellen wurden ebenso wie für den PRNT einen Tag vor Infektion angesetzt. Auch die Verdünnungsreihen wurden entsprechend dem PRNT angefertigt, mit dem Unterschied, dass für den FRNT für jede Probe zwölf Verdünnungen in Zweierschritten angesetzt wurden, die einen Konzentrationsbereich von 1:2 bis 1:4096 abdeckten.

Das bhPIV3-EGFP wurde auf 1950 pfu/ml verdünnt, so dass nach dem anschließenden Versetzen der Proben mit 100 µl Virussuspension jedes well der ELISA-Platte 195 pfu

bhPIV3-EGFP enthielt. Anschließend wurden, analog dem PRNT, nach dem Hinzugeben der Viren zu den verdünnten Seren eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem das Medium über den Zellen entfernt worden war, wurden die einzelnen Vertiefungen der 96well-Platte mit je 50 µl der Neutralisationsansätze versehen. Die einzelnen Ansätze wurden dabei tripliziert, so dass aus den 12 Neutralisationsansätzen 36 infizierte Vertiefungen resultierten. Pro Verdünnungsreihe wurden sechs weitere Vertiefungen lediglich mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle zur Bestimmung der Grundfluoreszenz der Zellen versetzt. Weitere sechs Vertiefungen wurden mit nicht neutralisierter Virussuspension versehen, um eine Positiv-Kontrolle der maximalen Fluoreszenzentwicklung zu erhalten.

5 Ergebnisse

5.1 Transfer und Aufbau des rekombinanten Genetiksystems

Die erste und für alle folgenden Arbeiten unabdingbare Aufgabenstellung dieses Projektes war es, das reverse Genetiksystem für die Erzeugung rekombinanter bhPIV3, welches zuvor am NIH verwendet worden war, an der Charité in der neu formierten Arbeitsgruppe „Molekulare Pneumologie und Infektiologie“ aufzubauen und die dafür notwendigen virologischen und molekularbiologischen Methoden vollständig neu zu etablieren.

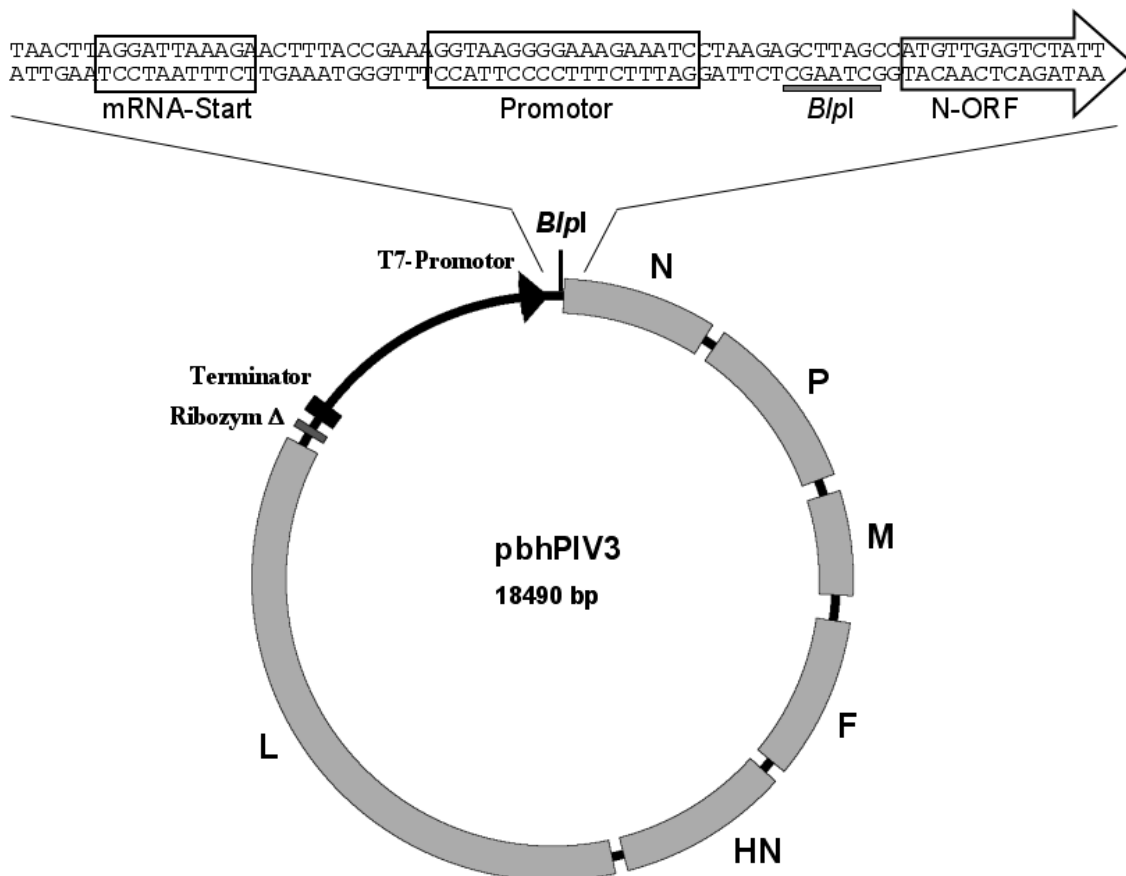


Abbildung 5.1: Vektorkarte des pbhPIV3

Das Plasmid pbhPIV3 kodiert die antigenomische cDNA des chimären bovin-humanen PIV3 unter der Kontrolle des T7-Promotors. Der cDNA des viralen Antigenoms folgt die Sequenz des Hepatitis Delta Virus-Ribozyms, das die entstandene RNA exakt nach der letzten Base des viralen Antigenoms schneidet. Dieser Sequenz folgt die T7-Terminatorsequenz.

Die singular vorhandene BlnI-Schnittstelle an Position 105 erlaubt das Einbringen weiterer Gene unmittelbar vor dem ersten viralen Leseraster.

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden mehrere Ansätze kompetenter Bakterien hergestellt. Die notwendigen kompetenten Bakterien wurden selbst nach der CaCl₂-Methode erzeugt. Die Kompetenz der Bakterien lag in den verschiedenen, während der Klonierung erzeugten Ansätzen bei 5x10⁵ bis 8x10⁶ cfu/mg pUC19 pro Milliliter Bakteriensuspension.

Zuerst wurden die aus den USA erhaltenen, zum reversen Genetiksystem gehörenden Plasmide pbhPIV3 (siehe Abbildung 5.1), pTM(N), pTM(P) und pTM(L) in Bakterien transfiziert und aus diesen im großen Maßstab zurückgewonnen. Parallel wurden 87 Sequenzierungs-Primer entworfen, um die auf den Plasmiden kodierten cDNA-Sequenzen für das virale RNA-Genom und die mRNAs des Polymerasekomplexes überprüfen zu können. Dabei wurde darauf geachtet, alle kodierenden Sequenzen aus beiden Richtungen zu sequenzieren. Die Sequenzen aller vier Plasmide erwiesen sich als korrekt.

Die benötigten Kulturzellen wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) erhalten und ihre dauerhafte Kultivierung im Labor etabliert, wobei bezüglich der Kulturbedingungen sowohl die Angaben der ATCC als auch jene der in der Datenbank *Pubmed* hinterlegten Veröffentlichungen, in welchen von Arbeiten mit den entsprechenden Zelllinien berichtet wurde, konsultiert wurden.

Das für die Herstellung der rekombinanten bhPIV3 notwendige MVA-T7 wurde dankenswerterweise von Bernard Moss (NIH) zur Verfügung gestellt. Es wurde in BHK-Zellen vermehrt und der TCID₅₀ Titer in BHK-Zellen bestimmt. Eine ausreichende Menge Virus für alle folgenden Versuche wurde bei -80 °C eingelagert. Der erhaltene Titer des MVA-T7 lag bei von 10⁸ TCID₅₀/ml.

Nachdem alle Vorbereitungen abgeschlossen waren, wurde versucht, durch Transfektion aller vier Plasmide [pbhPIV3, pTM(N), pTM(P), pTM(L)] und Infektion der Zellen mit MVA-T7 rekombinantes bhPIV3 von der cDNA des Antigenoms ausgehend zu generieren (siehe Abbildung 1.3). Dies gelang schon im ersten Anlauf, so dass die Etablierung des reversen Genetiksystems erfolgreich abgeschlossen war.

5.2 Herstellung neuer rekombinanter Viren

Ausgehend von den funktionalen Komponenten des reversen Genetik-Systems konnten im Folgenden neue rekombinante Viren hergestellt werden. Für die hier vorgestellten Arbeiten wurden sechs neue rekombinante Viren hergestellt. Fünf Viren exprimierten als zusätzliche Geneinheit je ein bekanntes starkes Antigen des *M. tb.*, ein sechstes rekombinantes Virus exprimierte das im UV-Licht grün fluoreszierende Protein EGFP.

Die fünf mykobakteriellen Gene AG85A, Cfp10, HspX, Mtb8.4 und Rv3407 wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Zum einen sollten Proteine des *M. tb.* exprimiert werden, deren Antigenität bereits vorbeschrieben war, zum anderen wurde Wert darauf gelegt, sowohl vom BCG exprimierte Proteine zu untersuchen (AG85A, Mtb8.4 und HspX), als auch Proteine zu exprimieren, die im BCG nicht oder im Vergleich zum *M. tb.* vermindert exprimiert werden (Cfp10, Rv3407).

5.2.1 Klonierungsstrategie

In einem ersten Schritt wurden die offenen Leseraster sowohl der *M. tb.*-Antigene als auch des EGFP mit Hilfe einer PCR amplifiziert, wobei das Genom des Bakteriums (*M. tb.*-Referenzstamm H37Rv) bzw. das Plasmid pEGFP-N1 als Matrize diente. Anschließend wurden die Amplifikate in pGEM-T subkloniert und die entstandenen DNAs sequenziert.

Mit Ausnahme der AG85A-Sequenz kodierten die gefundenen Nukleotidsequenzen für die in der Datenbank *Entrez-Protein* hinterlegten Protein-Sequenzen: Cfp10 (Protein-ID: NP_218391), EGFP (AAB02574), HspX (NP_216547), Mtb8.4 (NP_215690) und Rv3407 (NP_217924).

Für das AG85A (NP_218321) fand sich ein Aminosäureaustausch von Valin zu Glycin an Position 332, also nahe des C-Terminus des Proteins. Aufgrund der Tatsache, dass sich diese Substitution in allen sequenzierten Klonen fand, wurde angenommen, dass es sich eher um eine Variation in der genomischen DNA des Mykobakteriums als um ein PCR-Artefakt handelte. Auf die Möglichkeit, die in GenBank publizierte Sequenz des H37Rv durch *in vitro*-Mutagenese herzustellen, wurde bewusst verzichtet, da ein klinisches Isolat beschrieben ist, welches an dieser Position mit dem vor der klonierten Sequenz kodierten Aminosäure identisch ist (siehe Abbildung 5.2).

AAO62004
bhPIV3-AG85A
NP_218321_[H37Rv]

DSGTHSWEYWGAQLNAMKPDQLRALGATPNAVPAPOGA
DSGTHSWEYWGAQLNAMKPDQLRALGATPNTVPAPQGA
DSGTHSWEYWGAQLNAMKPDQLRALGATPNTGPAPQGA
*****:*****

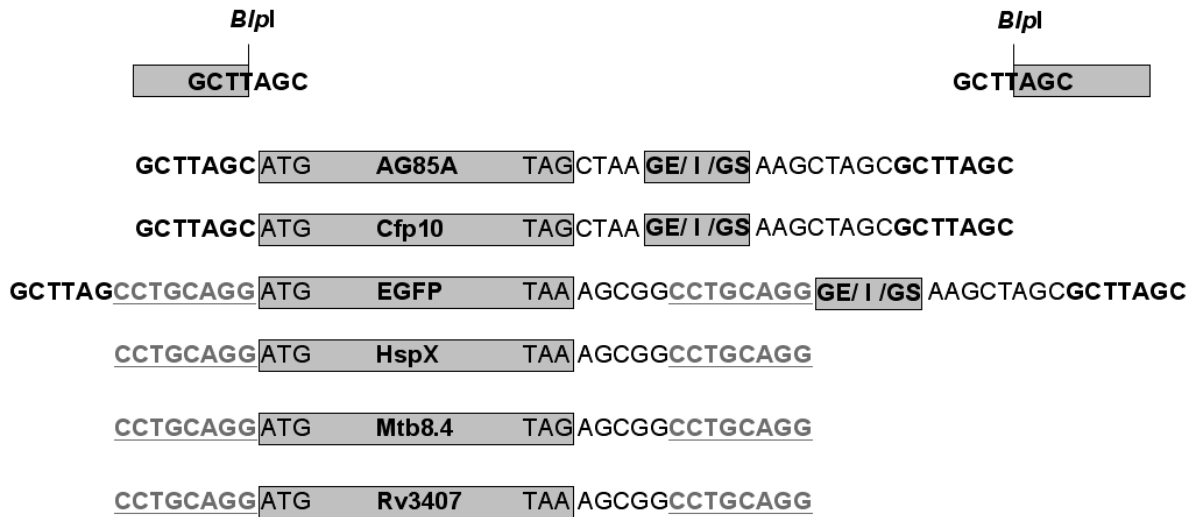
Abbildung 5.2: ClustalW-Sequenzvergleich der klonierten AG85A-Sequenz mit publizierten Sequenzen

Gezeigt sind die letzten 38 C-terminalen Aminosäuren (AS) des 338 AS langen Proteins. In das bhPIV3-AG85A wurde eine gegenüber dem Referenzstamm H37Rv (unten dargestellt, Protein-ID: NP_218321) veränderte Variante des AG85A integriert (Mitte). Die veränderte Aminosäure findet sich jedoch in einem klinischen Isolat des Jahres 2002 aus Thailand wieder (oben, Protein-ID: AAO62004). (*)= identische Aminosäure; (:)=konservativer Aminosäureaustausch.

Nach Sequenzierung der klonierten Amplifikate und Bestätigung der Nukleotidsequenzen wurden diese mittels Restriktionsverdau aus den pGEM-T-Konstrukten herausgeschnitten, um anschließend mit Hilfe einer einzigartigen *BlnI*-Schnittstelle als erstes Leseraster in das die antigenomische cDNA kodierende Plasmid pbhPIV3 kloniert zu werden. Die *BlnI*-Schnittstelle liegt zwischen dem Genstart des N-Gens und dem Beginn des Leserasters, also in der nicht translatierten Region am 5'-Ende (5'- *untranslated region*, 5'-UTR) des N-Gens (siehe Abbildung 5.1). Wird ein weiteres Leseraster über diese Schnittstelle in das Genom des Virus integriert, so wird für seine Transkription folglich das Genstart-Signal des N-Gens verwendet. Um nach erfolgreicher Insertion des zusätzlichen Leserasters die Transkription des nachfolgenden N-Gens sicherzustellen, müssen jedoch dem fremden Leseraster ein Genend-Signal, eine intergenische Sequenz und ein weiteres Genstart-Signal (GE/I/GS) des PIV3 folgen, es muss also eine komplette parainfluenzavirale Geneinheit eingefügt werden.

Diese zusätzlichen Sequenzen wurden für die ersten klonierten Gene (für AG85A und Cfp10) mit Hilfe sehr langer reverser Primer eingebracht. Um die Klonierung weiterer Antigene zu vereinfachen, wurden bei der Klonierung des EGFP zwei *SbfI*-Schnittstellen in das pbhPIV3-Plasmid eingebracht. Die neuen Schnittstellen flankierten das EGFP-Leseraster direkt. Dadurch wurden ein Ausschneiden des EGFP-Leserasters mit *SbfI* und die anschließende Religation des Plasmids ermöglicht. Das entstandene Plasmid (pbhPIV3-GE/I/GS-*SbfI*) wurde vermehrt und sequenziert. Im Folgenden konnten dann die weiteren *M. tb.*-Antigene über die *SbfI*-Schnittstelle in das pbhPIV3-GE/I/GS-*SbfI* kloniert werden, ohne dass ein weiteres Einbringen der GE/I/GS-Sequenz notwendig gewesen wäre (siehe Abbildung 5.3).

Bei allen Klonierungen wurde darauf geachtet werden, dass die Anzahl der zusätzlich in das Genom integrierten Nukleotide durch sechs teilbar war, um die *rule of six* nicht zu verletzen.



CCTGCAGG = *SbfI* - Schnittstelle

GCTTAGC = *BlnI* - Schnittstelle

GE/ I /GS = GTAAGAAAAA CTT AGGATTAAAG

Abbildung 5.3: Klonierungsstrategie

Mit Hilfe einer einzigartigen *BlnI*-Schnittstelle in der 5'UTR des ersten viralen Gens (N) werden zusätzliche fremde Leseraster in die cDNA des viralen Antigenoms eingefügt. Die von der viralen Polymerase benötigten cis-aktiven Sequenzen, also das Genende (GE), die lediglich aus den drei Basen (CTT) bestehende intergenische Sequenz (I) und das Genstart-Signal (GS) werden zusätzlich hinter dem neuen Leseraster eingefügt, damit die virale Polymerase monocistronische mRNAs von dem entstehenden viralen Genom transkribieren kann. In ersten Klonierungen (AG85A, Cfp10; oben) wurde die GE/ I /GS-Sequenz über lange reverse Primer in das Amplifikat eingeführt. Um diese Prozedur zu vereinfachen, wurde bei der dritten Klonierung das EGFP flankiert von zwei nicht im Genom vorhandenen *SbfI*-Schnittstellen integriert. Im Folgenden konnten über diese Schnittstelle nach Ausschneiden des EGFP andere Gene in das Genom integriert werden.

5.2.2 Herstellung und Nachweis der rekombinanten Viren

Die klonierten und sequenzierten cDNA-Plasmide wurden zusammen mit den Hilfsplasmiden pTM(N), pTM(P) und pTM(L) in HEp2-Zellen transfiziert, so dass nach Infektion der Zellen mit MVA-T7 rekombinante Viren von der antigenomischen cDNA generiert werden konnten. Es wurden jeweils parallel zwei Ansätze für jedes Virus durchgeführt. Fünf von sechs rekombinanten Viren konnten bereits im ersten Versuch hergestellt werden. Lediglich die Herstellung des bhPIV3-Rv3407 musste wiederholt werden, war jedoch im zweiten Versuch erfolgreich.

Nach Transfer der Zellkulturüberstände von HEp2-Zellen auf LLC-MK2-Zellen war in der Regel in der dritten Passage der Zellkulturüberstände ein deutlicher cytopathischer Effekt zu erkennen. In der sich anschließenden vierten Passage wurde in diesem Fall eine größere Anzahl LLC-MK2-Zellen infiziert (175cm²-Flasche, ca. 10⁷ Zellen), während der Rest des

Überstandes der dritten Passage als Originalvirus bei -80 °C eingelagert wurde. Die in der vierten Passage erhaltenen Überstände wurden mit Hilfe eines Plaque-Tests auf LLC-MK2-Zellen titriert. Die erhaltenen Titer dieser Passage lagen üblicherweise zwischen 10^6 und 10^7 pfu/ml. Neben der Quantifizierung der unterschiedlichen Viren wurden während der Etablierung des Plaque-Tests auch morphologische Unterschiede zwischen den durch die Viren hervorgerufenen Plaques deutlich:

Die rekombinanten bhPIV3 mit oder ohne Insert rufen auf LLC-MK2-Zellen wesentlich kleinere Plaques hervor als das hPIV3-Wildtypvirus. Konnten die hPIV3-Plaques bereits an Tag 6 deutlich nachgewiesen werden und waren an Tag 8 ohne Färbung bereits mit dem bloßen Auge erkennbar, so war für die bhPIV3 eine achttägige Inkubation gefolgt von einer Plaquefärbung zwingend notwendig (siehe Abbildung 5.4).

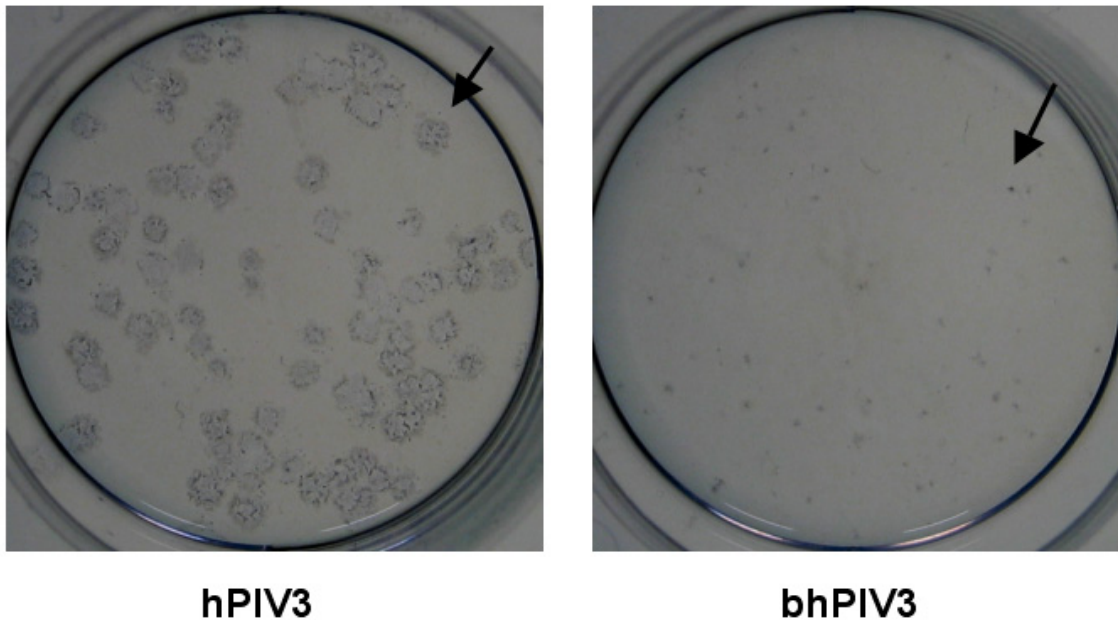


Abbildung 5.4: Unterschiede der Plaque-Größen im Plaque-Test

LLC-MK2-Zellen wurden mit seriellen Verdünnungen des angegebenen Virus entsprechend des Protokolls infiziert und nach achttägiger Inkubation mit einem hPIV3-spezifischen Antiserum angefärbt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Plaque-Größe. Gezeigt sind zwei Vertiefungen derselben 6well-Platte. Sowohl für das hPIV3 (links), als auch für das bhPIV3 (rechts) sind ca. 50 Plaques nachzuweisen. Zur besseren Orientierung ist jeweils ein Plaque mit einem Pfeil markiert.

5.3 Überprüfung der hergestellten rekombinanten Viren

Nach erfolgreicher Herstellung der rekombinanten Viren wurde deren Identität überprüft, indem zuerst die korrekte Transkription der zusätzlichen Antigene mittels RT-PCR und Sequenzierung nachgewiesen wurde, gefolgt von dem Nachweis der Fremdgen-Expression auf Proteinebene. Außerdem wurde das Wachstumsverhalten zweier rekombinanter bhPIV3-Vektoren mit leerem bhPIV3 und hPIV3 verglichen. Dabei handelte es sich um das bhPIV3-AG85A, welches das größte Insert trägt (ORF: 1017 bp) und das bhPIV3-Rv3407, dessen zusätzlicher ORF mit 300 bp eines der kleinsten Inserts darstellt.

5.3.1 Qualitativer Nachweis und Sequenzierung der mRNAs der in das Virusgenom zusätzlich integrierten Gene

Aus mit den rekombinanten Viren infizierten LLC-MK2-Zellen wurde RNA extrahiert, mit oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben und mit virusspezifischen PCR-Primern amplifiziert. Die Sequenzierung der Amplifikate bestätigte die mit der jeweiligen cDNA übereinstimmenden korrekten Basenfolgen.

5.3.2 Nachweis der Expression der zusätzlich in das Virusgenom integrierten Gene auf Proteinebene

Um einen Nachweis der Expression auf Proteinebene zu erbringen, wurden LLC-MK2-Zellen mit rekombinanten Viren infiziert (MOI 0,5 bis 1) und die Zellen am vierten Tag nach Infektion lysiert. Jeweils 25 µg der in den Lysaten enthaltenen Gesamtproteinmenge wurden auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt, durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran überführt und dort mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente jeweils ein divergentes rekombinantes Virus, welches ein anderes als das nachzuweisende Insert trug.



Abbildung 5.5: Nachweis der Genexpression auf Proteinebene

Jeweils 25 µg Gesamtprotein des Lysats infizierter Zellen wurde im Western-Blots untersucht, um die Proteinprodukte der zusätzlich in das virale Genom integrierten Leseraster nachzuweisen.

Bahn 1: Negativ-Kontrolle (Lysat der mit divergentem Virus infizierter Zellen)

Bahn 2: Lysat der mit dem zu überprüfendem Virus infizierten Zellen

Als Antikörper dienten verschiedene spezifische Antiseren und dazu passende Zweitantikörper nach Angabe des Herkunftslabors. Die den Proteinbanden entsprechenden Molekulargewichte wurden jeweils anhand eines vorgefärbten Standards auf dem zugehörigen Western-Blot bestimmt. Aufgrund der Dicke der Banden handelt es sich dabei um relativ ungenaue Schätzwerte, welche allerdings sehr gut mit den erwarteten Proteingrößen korrelierten.

Neben dem qualitativen Nachweis der Proteinexpression wurde mittels des Western-Blots auch die apparente Masse der Proteine überprüft. Dies geschah durch Vergleich der Laufweite der einzelnen Proteine mit dem auf der PVDF-Membran deutlich sichtbaren, bereits vorgefärbten Protein-Marker. Alle Antigene wiesen - im Rahmen der für Proteingele üblichen Ungenauigkeit - die erwarteten apparenten Massen auf (siehe Abbildung 5.5).

5.3.3 Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Viren nach Insertion der zusätzlichen Geneinheiten veränderte Wachstumseigenschaften aufweisen, wurde eine multizyklische Wachstumskurve erstellt. Das hPIV3-Wildtypvirus wurde dabei mit bhPIV3 ohne zusätzliche Geneinheit, mit bhPIV3-AG85A, dem rekombinanten Virus mit der längsten zusätzlichen Geneinheit und mit bhPIV3-Rv3407 (kurze zusätzliche Geneinheit) verglichen (siehe Abbildung 5.6).

Dafür wurden LLC-MK2-Zellen mit einer MOI von 0,01 infiziert und im Folgenden täglich ein Teil des Zellkulturüberstandes abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Es zeigte sich, dass das bhPIV3-Rv3407 ähnlich gut repliziert wie die beiden Kontrollviren, während hingegen die replikative Kapazität von bhPIV3-AG85A leicht vermindert ist.

Für hPIV3 liegt der maximale Titer bei $5,3 \times 10^7$ pfu/ml, für den leeren bhPIV3-Vektor bei $1,2 \times 10^8$ pfu/ml. Der maximale Titer von bhPIV3-AG85A erreicht nur 1×10^7 pfu/ml und liegt damit um den Faktor 5 bis 10 unter den Viren ohne Insert. Im Gegensatz zu den anderen Viren, die ihren maximalen Titer an Tag 3 erreichen, fällt dieser für bhPIV3-Rv3407 auf den Tag 4. Zu diesem Zeitpunkt erreicht das Virus einen Titer von $3,5 \times 10^7$ pfu/ml nachdem dieser am Tag zuvor lediglich bei $1,7 \times 10^7$ pfu/ml lag. Trotz dieser Anzeichen einer leichten Attenuierung *in vitro* wachsen die potentiellen Impfvektoren gut genug, um im Tierversuch eingesetzt zu werden.

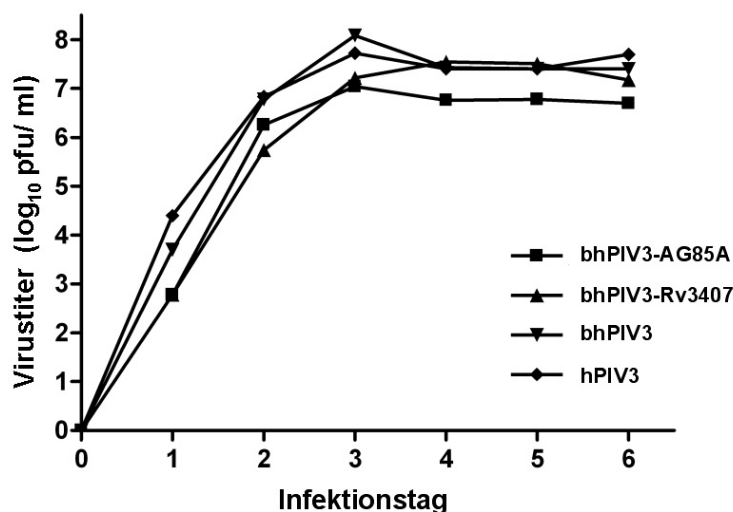


Abbildung 5.6: Multizyklische Wachstumskurve der rekombinanten bhPIV3-Vektoren im Vergleich zu bhPIV3 und hPIV3

Um die replikative Kapazität der bhPIV3-Vektoren zu überprüfen, wurden der Vektor mit dem längsten Insert (AG85A, 1017 bp) und ein Vektor mit einem der kürzesten Inserts (Rv3407, 300 bp) mit dem leeren bhPIV3-Vektor sowie hPIV3 verglichen. Dazu wurden LLC-MK2-Zellen mit einer MOI von jeweils 0,01 infiziert.

5.4 Replikation rekombinanter bhPIV3 in der Baumwollratte

Im Rahmen eines Versuches mit Baumwollratten wurden jeweils zehn Tiere mit bhPIV3, bhPIV3-AG85A und hPIV3 infiziert, während weitere zehn Tiere lediglich Zellkulturmedium erhielten. Jeweils fünf infizierte Tiere pro Gruppe wurden an Tag 3 p.i. getötet, um den Virustiter bestimmen zu können. An Tag 21 p.i. wurden dann weitere fünf Tiere pro Versuchstiergruppe getötet, um die Titer hPIV3-spezifischer neutralisierender Antikörper bestimmen zu können.

5.4.1 Wachstum der Viren

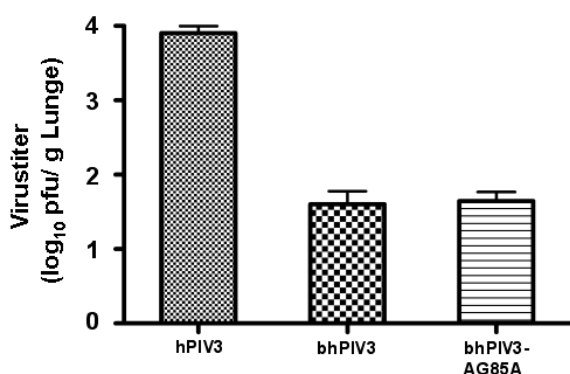


Abbildung 5.7: Virusreplikation in der Lunge von Baumwollratten

Die Lungen infizierter Tiere wurden an Tag 3 p.i. entnommen, homogenisiert und mittels Plaque-Test auf Viren untersucht. Während hPIV3 einen mittleren Titer von 7×10^3 pfu/g Lunge erreichte, erreichten bhPIV3 und bhPIV3-AG85A lediglich einen Titer von 40 pfu/g Lunge. In den Lungen der mit Medium infizierten Kontrolltiere konnte kein Virus nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Es zeigte sich, dass die untersuchten Viren in der Baumwollratte unterschiedlich gut replizierten: Während hPIV3 an Tag 3 p.i. einen Titer von 7×10^3 pfu/ml pro Gramm Lunge erreichte, lagen die Titer der rekombinanten bhPIV3-Viren bei 40 pfu/ml, in Höhe der Nachweisgrenze (siehe Abbildung 5.7). Das geringere Wachstum der bhPIV3-Vektoren ist im Vergleich zu hPIV3 statistisch signifikant (jeweils $p < 0,001$), die beiden bhPIV3-Vektoren replizieren hingegen statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,7$).

5.4.2 Neutralisierende Antikörper

Als neutralisierende Antikörper werden Antikörper bezeichnet, welche die virale Infektion unterbinden. Bei Parainfluenzaviren sind dies Antikörper, die gegen das F-Protein oder das HN-Protein gerichtet sind und durch Bindung an diese Proteine das Eindringen der Viren in die Wirtszelle verhindern.

Der Titer neutralisierender Antikörper wurde zunächst mit Hilfe eines Plaque-Reduktions-Neutralisations-Assays (PRNT) bestimmt. Dafür wurden die an Tag 21 nach der Infektion der Baumwollratten gewonnenen Seren seriell verdünnt und mit ca. 40 pfu hPIV3 für eine halbe Stunde inkubiert. Von diesen Neutralisationsansätzen ausgehend, wurden anschließend je Verdünnung zwei Vertiefungen einer 24well-Platte infiziert. Um die Zahl der tatsächlich in die Vertiefungen überführten Viren bestimmen zu können, wurden Neutralisationsansätze mitgeführt, welche zwar Virus, jedoch kein Serum enthielten.

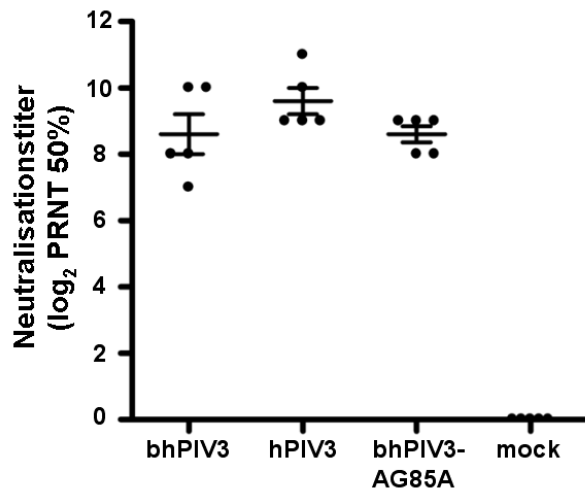


Abbildung 5.8: Messung der Neutralisationstiter mit Hilfe eines PRNT

Vermessen wurden die bereits einheitlich 1:3 verdünnten Seren der mit bhPIV3, hPIV3, bhPIV3-AG85A oder lediglich mit Zellkulturmedium infizierten und an Tag 21 getöteten Tiere. Die Seren der Kontrolltiere zeigten keine Neutralisation. Für jedes der fünfzehn vermessenen Seren der mit Viren infizierten Tiere ist der Mittelwert zweier unabhängiger Messungen dargestellt, für die nicht infizierten Tiere (mock) wurde keine Neutralisation festgestellt. Dargestellt sind die Einzelwerte einer Messung für jedes Tier, die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe und der Standardfehler des Mittelwertes. Für die hPIV3-infizierten Tiere (Mittelwert: 9,6) konnte ein höherer Neutralisationstiter gegenüber bhPIV3 (8,6) und bhPIV3-AG85A (8,6) festgestellt werden. Dieser Unterschied ist jedoch in einem t-Test nicht signifikant. Der Versuch wurde mehrfach mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Als erfolgreich neutralisiert wurden Verdünnungen angesehen, bei denen die Zahl der Plaques im Mittel im Vergleich zu den nicht neutralisierten Kontrollen um mindestens die Hälfte reduziert war (PRNT 50%). Der Neutralisationstiter wurde als jene Verdünnung ausgelesen, ab welcher alle folgenden Vertiefungen der Verdünnungsreihe nicht mehr neutralisiert wurden. Während sich für die nicht infizierten Tiere wie erwartet keine Neutralisation darstellte, unterschieden sich die durch hPIV3, bhPIV3 und bhPIV3-AG85A induzierten Neutralisationstiter weder in einem nicht-parametrischen Test (Kruskal-Wallis-Test) noch in einem parametrischen Test (t-Test) signifikant voneinander (siehe Abbildung 5.8). Der Versuch wurde mehrfach durchgeführt und resultierte in ähnlichen Ergebnissen.

5.5 Protektiver Effekt der bhPIV3-Vektoren gegen *M. tb.*

Der protektive Effekt der *M. tb.*-Antigene-exprimerenden bhPIV3-Vektoren gegen *M. tb.*-Aerosolinfectionen wird derzeit in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin in Rahmen experimenteller *M. tb.*-Infektionen in Balb/c-Mäusen evaluiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse eines ersten Versuches beschrieben, dessen Ergebnisse bisher nicht bestätigt werden konnten. Eine schematische Übersicht des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

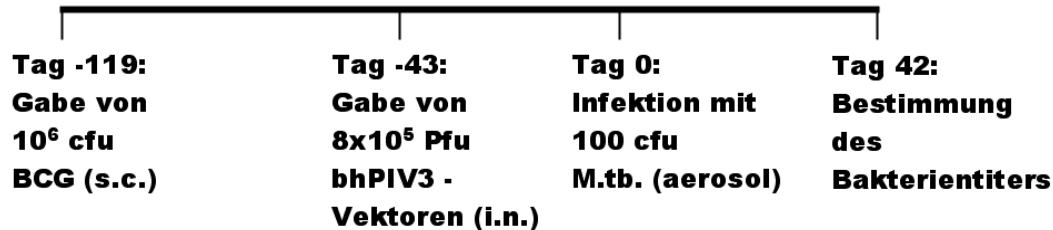


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus – Impfung und Challenge von Balb/c-Mäusen

Sechs Versuchstiergruppen von jeweils fünf Balb/c-Mäusen erhielten eine BCG-Immunisierung an Tag -119 gefolgt von einer Boost-Impfung an Tag -43 mit jeweils einem der fünf bhPIV3-Vektoren (Gruppen 1 bis 5) oder aber mit einem Gemisch der Vektoren (Gruppe 6). Die Gruppen 7 bis 12 wurden entsprechend den Gruppen 1 bis 6 mit Parainfluenzaviren infiziert, jedoch ohne zuvor eine BCG-Immunisierung zu erhalten. Drei Kontrollgruppen wurden mitgeführt: Eine Gruppe mit nicht immunisierten Tieren, eine Gruppe, die lediglich an Tag -43 mit bhPIV3 ohne Insert infiziert wurde und eine Gruppe, die an Tag -119 lediglich mit BCG immunisiert wurde. 42 Tage nach der Aerosol-Infektion mit 100 cfu *M. tb.* wurden die Tiere getötet und der Bakterientiter in Milz und Lunge bestimmt.

43 Tage vor der experimentellen *M. tb.*-Infektion wurden Gruppen von fünf Tieren - entweder elf Wochen nach vorausgegangener subcutaner Gabe von 10^6 cfu BCG oder ohne vorausgehende Immunisierung - mit 8×10^5 pfu bhPIV3-AG85A, bhPIV3-Cfp10, bhPIV3-Mtb8.4, bhPIV3-HspX oder bhPIV3-Rv3407 durch intranasale Applikation infiziert. Eine weitere Gruppe wurde mit allen fünf Viren (insgesamt 8×10^5 Pfu) simultan infiziert. (siehe Abbildung 5.9). Alle Tiere wurden an Tag 0 mit 100 cfu *M. tb.* im Aerosol infiziert und 42 Tage später getötet um den mykobakteriellen Titer in Milz und Lunge zu bestimmen. Zu den genannten zwölf Versuchstiergruppen traten drei Kontrollgruppen: Eine Gruppe, welche nicht immunisiert wurde, eine Gruppe, die lediglich an Tag -119 BCG erhielt und eine weitere Versuchstiergruppe, die lediglich an Tag -43 mit dem leeren bhPIV3-Vektor infiziert wurden. Zur Überprüfung des Erfolgs der viralen und der mykobakteriellen Infektionen wurden weitere Tiere getötet, um die jeweiligen Titer zu bestimmen.

5.5.1 Wachstum der Viren im Mausmodell

Aus in der Literatur beschriebenen Versuchen ist bekannt, dass Mäuse für hPIV3 nur semipermissiv sind, d.h. dass die Replikation von hPIV3 im Vergleich zu seronegativen Kindern nur eingeschränkt stattfindet. Zur Replikation von bhPIV3 in Mäusen existieren bisher keine veröffentlichten Daten. Um die Permissivität von Balb/c-Mäusen für bhPIV3 zu bestimmen, wurden jeweils fünfzehn Tiere mit dem leeren bhPIV3 oder mit bhPIV3 Rv3407 infiziert. An den Tagen 2, 4 und 7 p.i. wurden jeweils fünf Tiere getötet, um die Lungen zu entnehmen und anschließend den Virustiter im Lungenhomogenisat mit Hilfe eines Plaque-Tests zu bestimmen.

An Tag 2 p.i. wurden Titer von $1,3 \times 10^3$ pfu/g Lunge für bhPIV3 und $1,9 \times 10^3$ pfu/g Lunge für bhPIV3-Rv3407 gemessen. An Tag 4 p.i. waren nur noch 90 pfu/g Lunge für bhPIV3 und 20 pfu/g Lunge für bhPIV3-Rv3407 nachweisbar (siehe Abbildung 5.10). An Tag 7 p.i. war keine Virusreplikation mehr nachweisbar (nicht abgebildet).

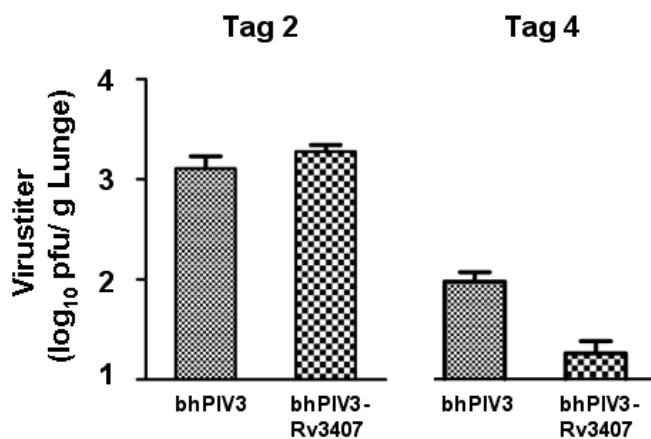


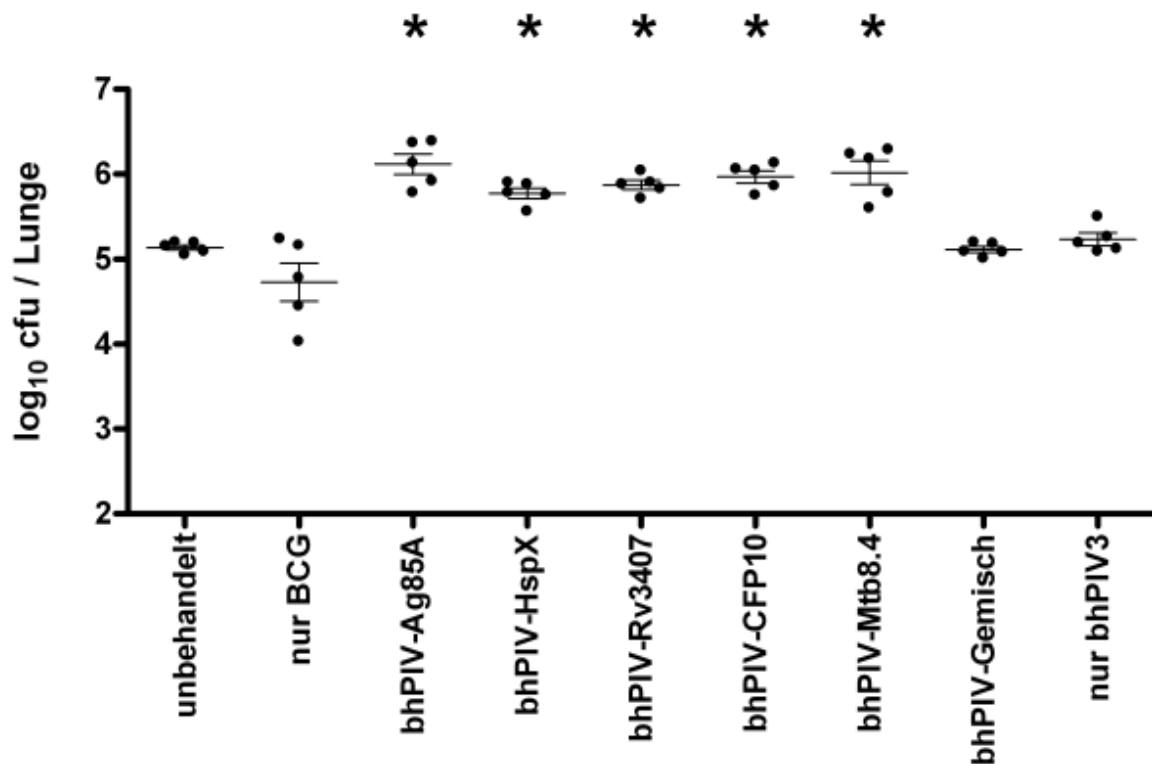
Abbildung 5.10: Virusreplikation in der Lunge von Balb/c-Mäusen

An den Tagen 2, 4 und 7 nach intranasaler Inokulation von Balb/c-Mäusen mit 8×10^5 pfu der Viren wurde die Viruslast im Lungenhomogenisat mit Hilfe eines Plaque-Test bestimmt. An Tag 7 p.i. waren keine Viren mehr nachweisbar.

5.5.2 Protektiver Effekt der Impfung mit bhPIV3-Vektoren mit und ohne vorausgegangenes BCG-*Priming*

Um die erfolgreiche Infektion mit *M. tb.* nach Aerosol-Exposition nachzuweisen, wurden einen Tag nach Exposition fünf nicht immunisierte Tiere getötet, die Lungen homogenisiert und die Bakterienlast in der Lunge bestimmt. Es wurden dabei durchschnittlich 100 cfu Mykobakterien pro Lunge nachgewiesen, wobei sich die Werte für die individuellen Tiere zwischen 84 cfu und 127 cfu bewegten.

An Tag 42 nach der Infektion mit *M. tb.* wurden die Tiere der oben beschriebenen 15 Versuchsgruppen getötet und der *M. tb.*-Titer im Lungenhomogenisat bestimmt. Für die unbehandelten Tiere wurden mittlere Titer von $1,3 \times 10^5$ cfu *M. tb.* pro Lunge und $3,8 \times 10^3$ cfu pro Milz gefunden. Die mit BCG immunisierten Tiere hingegen trugen durchschnittlich $5,4 \times 10^4$ cfu Mykobakterien in der Lunge und $2,2 \times 10^2$ cfu in der Milz. In beiden Organen ist somit ein protektiver Effekt durch die BCG-Immunisierung zu erkennen, der aber aufgrund der hohen Streuung nur für die Milz statistisch signifikant ist. Für die ausschließlich mit dem leeren bhPIV3-Vektor infizierte Gruppe wurde in der Lunge ein mittlerer Titer von $1,7 \times 10^5$ cfu bestimmt, also ein Titer, der sich nicht signifikant von dem unbehandelter Tiere unterscheidet. Der mittlere Titer in der Milz lag in dieser Gruppe bei $5,2 \times 10^2$ cfu, also um den Faktor sieben bis acht niedriger als in der unbehandelten Gruppe. Im Rahmen eines t-Tests ergibt sich ein p-Wert von 0,025, der allerdings aufgrund der Bonferoni-Korrektur des unterliegenden multiplen Vergleiches wegen nicht das Signifikanzniveau ($p < 0,003$) erreicht.



Gruppe	Titer (log ₁₀ cfu)	p - Wert vs. BCG
unbehandelt	5,14 ± 0,03	0,111
nur BCG	4,73 ± 0,22	-
nur bhPIV3	5,24 ± 0,07	0,0652
bhPIV3 - AG85A	6,12 ± 0,12	0,0006
bhPIV3 - HspX	5,77 ± 0,06	0,002
bhPIV3 - Rv3407	5,88 ± 0,05	0,0011
bhPIV3 - Cfp10	5,97 ± 0,07	0,0008
bhPIV3 - Mtb8.4	6,02 ± 0,14	0,0012
bhPIV3 - Gemisch	5,12 ± 0,03	0,1291

Abbildung 5.11: M. tb.-Titer in der Lunge der nicht geprimten Versuchstiere an Tag 42 p.i.

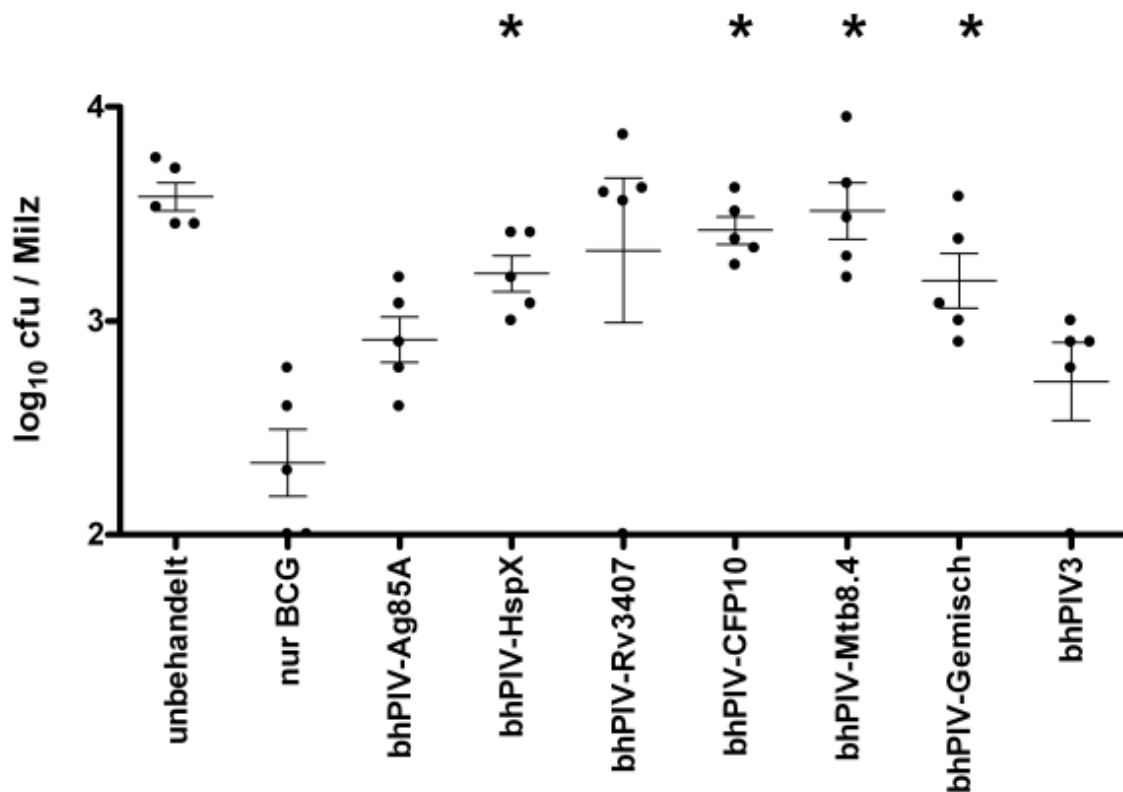
oben: Auftragung der Einzelwerte;

unten: mittlere geometrische Titer und p-Werte (t-Test) im Vergleich zur BCG-Gruppe

Balb/c-Mäuse wurden mit 8×10^5 pfu der rekombinanten bhPIV3 immunisiert und 43 Tage später mit 100 cfu M. tb. infiziert. An Tag 42 p.i. wurden die Tiere getötet und Milz und Lunge entnommen, homogenisiert und der Bakterientiter bestimmt. Die Nachweisgrenze für die Titration aus Lungen lag bei 400 cfu/ Lunge.

Zur statistischen Analyse wurden die Titer logarithmiert und mittels eines t-Tests die erhaltenen Werte jeweils einer Versuchsgruppe mit der BCG-Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund des Vergleiches multipler Versuchsgruppen mit der gleichen Kontrolle, wurde der p-Wert der einzelnen Vergleiche mit Hilfe der Bonferroni-Methode korrigiert. Um insgesamt ein Konfidenzintervall von $p=0,05$ einzuhalten, liegt das Signifikanzniveau für die einzelnen Vergleiche bei $p=0,003$.

Die mit einem Stern (*) markierten Gruppen trugen eine im Vergleich zur BCG-Kontrollgruppe signifikant unterschiedliche Zahl Bakterien in der Lunge ($p<0,003$).



Gruppe	Titer (\log_{10} cfu)	p - Wert vs. BCG
unbehandelt	$3,58 \pm 0,07$	$< 0,0001$
nur BCG	$2,34 \pm 0,16$	-
nur bhPIV3	$2,72 \pm 0,18$	0,1527
bhPIV3 - AG85A	$2,91 \pm 0,11$	0,016
bhPIV3 - HspX	$3,22 \pm 0,08$	0,0011
bhPIV3 - Rv3407	$3,33 \pm 0,34$	0,282
bhPIV3 - Cfp10	$3,42 \pm 0,07$	0,0002
bhPIV3 - Mtb8.4	$3,52 \pm 0,13$	0,0004
bhPIV3 - Gemisch	$3,19 \pm 0,13$	0,0029

Abbildung 5.12: M. tb.-Titer in der Milz der nicht geprimten Versuchstiere an Tag 42 p.i.

oben: Auftragung der Einzelwerte;

unten: mittlere geometrische Titer und p-Werte (t-Test) im Vergleich zur BCG-Gruppe

Balb/c-Mäuse wurden zuerst mit 8×10^5 pfu der rekombinanten bhPIV3 immunisiert und 43 Tage später mit 100 cfu M. tb. infiziert. An Tag 42 p.i. wurden die Tiere getötet und Milz und Lunge entnommen, homogenisiert und der Bakterientiter bestimmt. Die Nachweisgrenze für die Titration aus Milzen lag bei 200 cfu/Milz. Für jene Tiere, in deren Milzen keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurde ein Titer von 100 cfu/ Milz (Hälfte der unteren Nachweisgrenze) angenommen.

Zur statistischen Analyse wurden die Titer logarithmiert, und mittels eines t-Tests die erhaltenen Werte jeweils einer Versuchsgruppe mit der BCG-Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund des Vergleiches multipler Versuchsgruppen mit der gleichen Kontrolle, wurde der p-Wert der einzelnen Vergleiche mit Hilfe der Bonferoni-Methode korrigiert. Um insgesamt ein Konfidenzintervall von $p=0,05$ einzuhalten, liegt das Signifikanzniveau für die einzelnen Vergleiche bei $p=0,003$.

Die mit einem Stern (*) markierte Gruppen trugen eine im Vergleich zur BCG-Kontrollgruppe signifikant unterschiedliche Zahl Bakterien in der Milz ($p<0,003$).

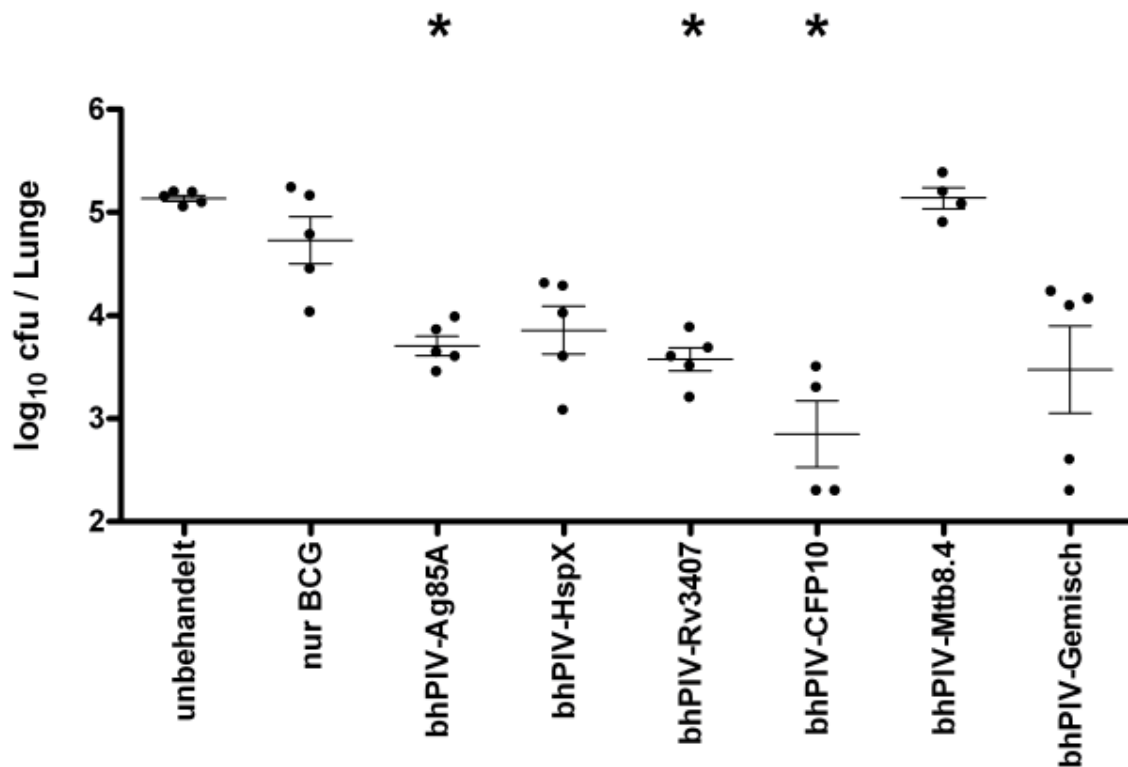
Ohne BCG-*Priming* kann durch Impfung mit bhPIV3-Vektoren, die verschiedene *M. tb.*-Antigene in der Mukosa des Respirationstraktes exprimieren, keine protektive Wirkung gegen die *M. tb.*-Replikation in der Lunge der Maus erzielt werden. Die mittleren Titer der fünf Gruppen, welche je eines der *M. tb.*-Antigene exprimierenden Viren erhalten hatten, lagen zwischen $5,8 \times 10^5$ und $6,1 \times 10^5$ cfu/Lunge. Dies bedeutet zeigt nicht nur das Ausbleiben einer Verminderung der Bakterienlast sondern sogar eine signifikante Erhöhung derselben im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 5.11).

Für die Milz, welche als Korrelat des Schutzes gegen extrapulmonale Tuberkulose gelten kann, zeigt sich ein anderes Bild: Hier zeigt die Impfung mit den bhPIV3-Vektoren allein zumindest einen eingeschränkten protektiven Effekt. Mit bhPIV3-AG85A gelingt es, den bakteriellen Titer gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren um den Faktor 4,5 zu senken. Jedoch erreicht keines der Viren allein den von BCG hervorgerufenen Schutzeffekt (siehe Abbildung 5.12).

Folgt die Impfung mit bhPIV3-Vektoren, die *M. tb.*-Antigene exprimieren, einem BCG-*Priming*, so zeigt sich ein deutlicher additiver protektiver Effekt. Die *Boost*-Impfung mit bhPIV3-cfp10 führt zu einer Reduktion des mittleren bakteriellen Titers in der Lunge um den Faktor 75 im Vergleich zu der mit BCG allein geimpften Gruppe auf $7,1 \times 10^2$ cfu (siehe Abbildung 5.13). Dabei konnten in zwei Tieren keine Mykobakterien nachgewiesen werden, so dass ein Titer von 200 cfu (die Hälfte der unteren Nachweisgrenze) angenommen wurde. In der Milz konnte in keinem der mit BCG geprimten und mit bhPIV3-cfp10 geboosteten Tiere Mykobakterien nachgewiesen werden. Der angenommene Titer liegt dementsprechend bei 10^2 cfu, der Hälfte der unteren Nachweisgrenze.

Auch eine Boost-Immunisierung mit bhPIV3-AG85A und bhPIV3-Rv3407 konnte die bakteriellen *M. tb.*-Titer nach Aerosol-Challenge signifikant senken. Die zusätzliche Gabe des bhPIV3-AG85A reduzierte den *M. tb.*-Titer in der Lunge um den Faktor 10 auf $5,1 \times 10^3$ cfu. In der Milz lag der mittlere Titer mit $1,7 \times 10^2$ cfu im selben Bereich wie der Titer der nur mit BCG immunisierten Tiere. Die bhPIV-Rv3407-Impfung senkte den mittleren *M. tb.*-Titer in der Lunge im Vergleich mit den BCG-immunisierten Tieren um den Faktor 15 auf $3,6 \times 10^3$ cfu in der Lunge, während der mittlere Titer in der Milz mit $2,3 \times 10^2$ cfu wiederum vergleichbar war mit jenem der mit BCG immunisierten Gruppe (siehe Abbildung 5.14).

Die Impfung mit bhPIV3-Mtb8.4 bot auch nach BCG-*Priming* keine protektive Wirkung. Mit BCG immunisierte und anschließend mit bhPIV3-Mtb8.4 immunisierte Tiere trugen $1,3 \times 10^5$ cfu in der Lunge und 4×10^3 cfu *M. tb.* in der Milz, also einen im Vergleich zur BCG-Gruppe für die erhöhten Bakterientiter.



Gruppe	Titer (log ₁₀ cfu)	p - Wert vs. BCG
unbehandelt	5,14 ± 0,03	0,111
nur BCG	4,73 ± 0,22	-
bhPIV3 - AG85A	3,71 ± 0,09	0,0029
bhPIV3 - HspX	3,86 ± 0,23	0,0269
bhPIV3 - Rv3407	3,58 ± 0,11	0,0017
bhPIV3 - Cfp10	2,85 ± 0,28	0,0016
bhPIV3 - Mtb8.4	5,14 ± 0,10	0,1712
bhPIV3 - Gemisch	3,48 ± 0,42	0,0301

Abbildung 5.13: M. tb.-Titer in der Lunge geprimter Versuchstiere an Tag 42 p.i.

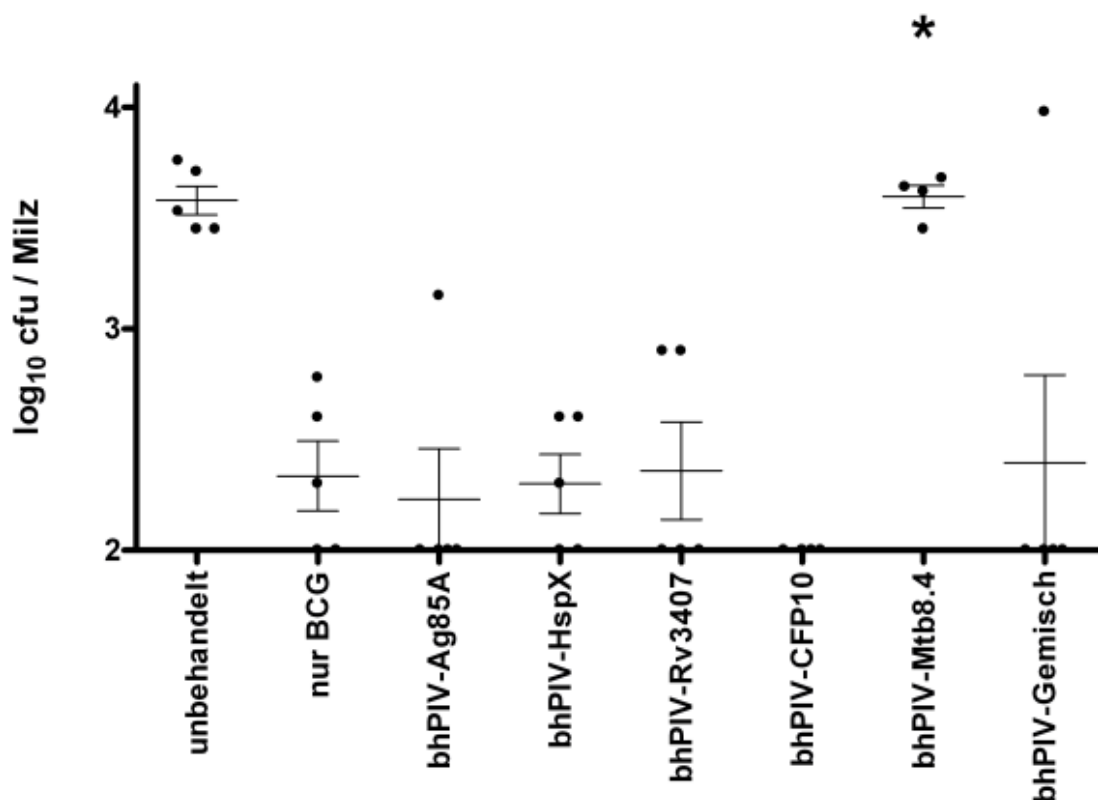
oben: Auftragung der Einzelwerte;

unten: mittlere geometrische Titer und p-Werte (t-Test) im Vergleich zur BCG-Gruppe

Balb/c-Mäuse wurden zuerst mit 10^6 cfu BCG und 119 Tage später mit 8×10^5 pfu rekombinanten bhPIV3 immunisiert, um weitere 43 Tage später mit 100 cfu M. tb. infiziert zu werden. An Tag 42 p.i. wurden die Tiere getötet und Milz und Lunge entnommen, homogenisiert und der Bakterientiter bestimmt. Die Nachweisgrenze für die Titration aus Lungen lag bei 400 cfu/ Lunge. Für jene Tiere, für die keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurde ein Titer von 200 cfu/ Lunge angenommen (halbe Nachweisgrenze).

Zur statistischen Analyse wurden die Titer logarithmiert, und mittels eines t-Tests die erhaltenen Werte jeweils einer Versuchsgruppe mit der BCG-Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund des Vergleiches multipler Versuchsgruppen mit der gleichen Kontrolle, wurde der p-Wert der einzelnen Vergleiche mit Hilfe der Bonferoni-Methode korrigiert. Um insgesamt ein Konfidenzintervall von $p=0,05$ einzuhalten, liegt das Signifikanzniveau für die einzelnen Vergleiche bei $p=0,003$.

Die mit einem Stern (*) markierten Gruppen trugen eine im Vergleich zur BCG-Kontrollgruppe signifikant unterschiedliche Zahl Bakterien in der Lunge ($p<0,003$).



Gruppe	Titer (log ₁₀ cfu)	p - Wert vs. BCG
unbehandelt	3,58 ± 0,07	< 0,0001
nur BCG	2,34 ± 0,16	-
bhPIV3 - AG85A	2,23 ± 0,23	0,7102
bhPIV3 - HspX	2,3 ± 0,14	0,8690
bhPIV3 - Rv3407	2,36 ± 0,22	0,9289
bhPIV3 - Cfp10	2,0 ± 0	0,1
bhPIV3 - Mtb8.4	3,6 ± 0,05	0,0002
bhPIV3 - Gemisch	2,4 ± 0,4	0,8912

Abbildung 5.14: M. tb.-Titer in der Milz geprimter Versuchstiere an Tag 42 p.i.

oben: Auftragung der Einzelwerte;

unten: mittlere geometrische Titer und p-Werte (t-Test) im Vergleich zur BCG-Gruppe

Balb/c-Mäuse wurden zuerst mit 10^6 cfu BCG und 119 Tage später mit 8×10^5 pfu rekombinanten bhPIV3 immunisiert, um weitere 43 Tage später mit 100 cfu M. tb. infiziert zu werden. An Tag 42 p.i. wurden die Tiere getötet und Milz und Lunge entnommen, homogenisiert und der Bakterientiter bestimmt. Die Nachweisgrenze für die Titration in Milzen lag bei 200 cfu/ Milz. Für Tiere, in deren Milzen keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurde ein Titer von 100 cfu/ Milz angenommen (Hälfte der unteren Nachweisgrenze).

Zur statistischen Analyse wurden die Titer logarithmiert, und mittels eines t-Tests die erhaltenen Werte jeweils einer Versuchsgruppe mit der BCG-Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund des Vergleiches multipler Versuchsgruppen mit der gleichen Kontrolle, wurde der p-Wert der einzelnen Vergleiche mit Hilfe der Bonferoni-Methode korrigiert. Um insgesamt ein Konfidenzintervall von $p=0,05$ einzuhalten, liegt das Signifikanzniveau für die einzelnen Vergleiche bei $p=0,003$.

Die mit einem Stern (*) markierten Gruppen trugen eine im Vergleich zur BCG-Kontrollgruppe signifikant unterschiedliche Zahl Bakterien in der Lunge ($p<0,003$).

5.6 Charakterisierung und Anwendung des bhPIV3-EGFP

Aufgrund seiner leichten Detektierbarkeit war bhPIV3-EGFP ursprünglich lediglich als Kontrollvirus vorgesehen. Im Laufe der Arbeiten wurde es dann zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen herangezogen, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

5.6.1 Viruswachstum und Expression der in das virale Genom zusätzlich integrierten Leseraster

Aufgrund der aus der hohen Expression des EGFP resultierenden sichtbaren Grünfärbung virusinfizierter Zellen im Tageslicht war bhPIV3-EGFP das erste der in diese Arbeit generierten rekombinanten Viren, für das die Expression eines in das virale Genom integrierten zusätzlichen Leserasters zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 5.15).

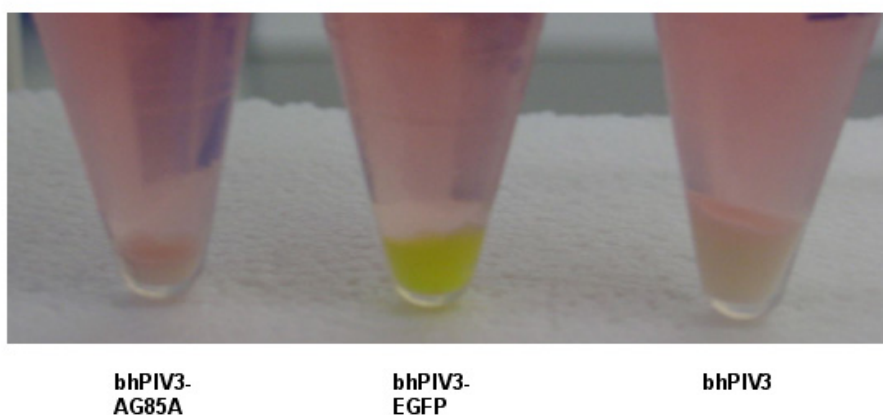


Abbildung 5.15: Fluoreszenz pelletierter LLC-MK2-Zellen nach viertägiger Infektion mit verschiedenen rekombinanten Parainfluenzaviren

Im Rahmen der Herstellung von Proben zum Nachweis der zusätzlich in das virale Genom eingebrachten Geneinheiten auf Proteinebene, wurden LLC-MK2-Zellen mit einer MOI zwischen 0,1 und 0,5 infiziert und nach drei oder vier Tagen, nach Einsetzen eines deutlich sichtbaren cytopathischen Effektes mit Hilfe von Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst. Nach Abbruch der Verdauungsreaktion durch Zugabe von Serum-haltigem Zellkulturmedium wurden die Zellen zentrifugiert.

Aus dieser Beobachtung erwuchs die Frage, wie viele infizierte Zellen bzw. wie viele EGFP-exprimierende Viren benötigt werden, um ein eindeutiges Fluoreszenz-Signal zu erhalten. Diese Fragestellung wurde im Folgenden durch eine Versuchsreihe beantwortet, bei der konfluent bewachsene 96well-Platten mit seriellen Verdünnungen titrierter bhPIV3-EGFP-Vektoren infiziert wurden. Nachdem erste Ergebnisse zeigten, dass die Lyse der Zellen mit einer Lösung aus 1 % Triton-X 100 in PBS die Fluoreszenz des EGFP nicht negativ

beeinflusst, wurden im Folgenden die infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und die Lysate im Fluorometer vermessen (siehe Abbildung 5.16). Dabei wurde die Fluoreszenz mit Licht der Wellenlänge $485 \pm 12,5$ nm angeregt, und die Emission bei einer Wellenlänge von 520 ± 10 nm gemessen.

Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Infektionsdosis und der Infektionsdauer gemessen werden. Während $2,8 \times 10^4$ pfu Viren notwendig waren, um nach 24 Stunden ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zu erhalten, konnte mit einer einstelligen Zahl infektiöser Viren erst nach 72 Stunden ein erhöhtes Fluoreszenzsignal gemessen werden.

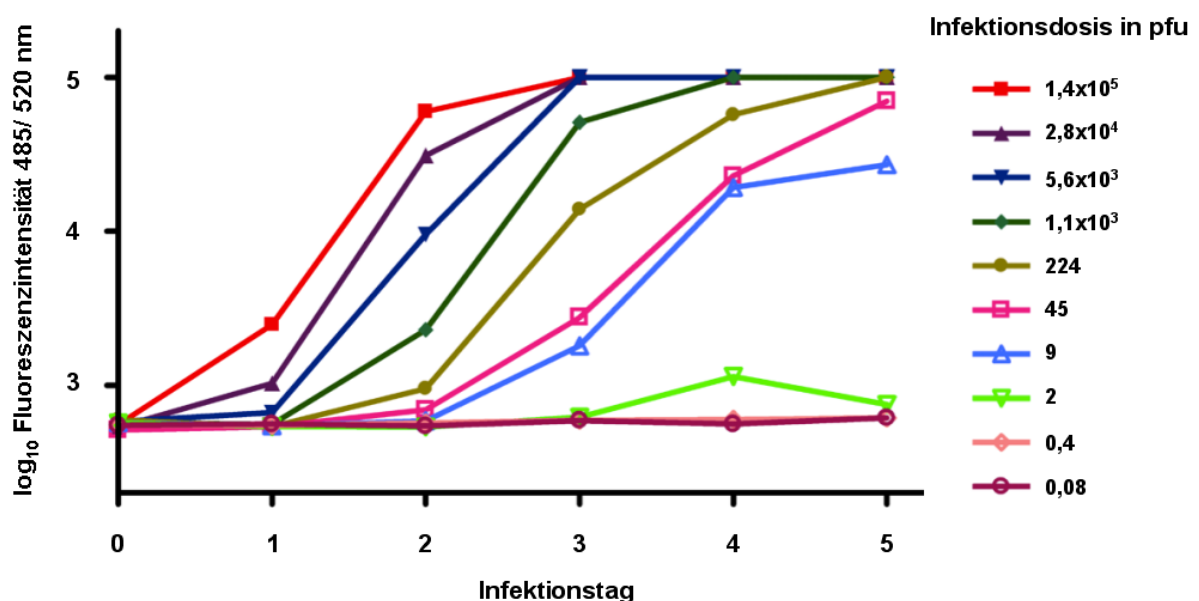


Abbildung 5.16: Wachstum und Fluoreszenzentwicklung des bhPIV3-EGFP

Beispiel einer Versuchsreihe zur Ermittlung der Zunahme der Fluoreszenzintensität von mit bhPIV3-EGFP infizierten Zellkulturen in Abhängigkeit von Infektionsdosis (siehe Legende rechts) und Infektionsdauer. Aufgetragen wurde die Fluoreszenz bei 520 nm gegen die Infektionsdauer.

5.6.2 Tropismusuntersuchungen mit Hilfe des bhPIV3-EGFP

Im Folgenden wurde überprüft, ob sich die erfolgreiche Infektion von Zellen mit bhPIV3-EGFP auch durchflusszytometrisch darstellen lässt. Dazu wurde eine Auswahl von Kulturzellen, welche sowohl adhärent wachsende Epithelzellen (A549, LLC-MK2, HEp2) als auch in Suspension wachsende humane Immunzelllinien (Jurkat, THP-1) enthielt, mit bhPIV3-EGFP infiziert. Die Zellen wurden an Tag 4 p.i. geerntet und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie einer durchflusszytometrischen Messung unterzogen. Gemessen wurden dabei drei zelluläre Eigenschaften: Die Größe der Zellen wurde mit Hilfe des FSC und die Granularität derselben mit Hilfe des SSC bestimmt. Die Emission von Licht der Wellenlänge 520 nm wurde im Fluoreszenz-Kanal 3 des Gerätes gemessen. Es zeigte sich in allen fünf Zelllinien eine deutlich erhöhte Fluoreszenz bei 520 nm im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen (siehe Tabelle 5.1)

Tabelle 5.1: Durchflusszytometrischer Nachweis der Empfänglichkeit verschiedener Kulturzelllinien für Infektionen mit bhPIV3-EGFP

Die drei Epithelzelllinien A549, LLC-MK2 und HEp2, sowie die beiden Suspensionszelllinien Jurkat und THP-1 wurden mit bhPIV3-EGFP infiziert (MOI=0,5), während jeweils uninfizierte Kontrollzellen mitgeführt wurden. Nach viertägiger Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und einer Messung im Durchflusscytometer unterzogen, bei der jeweils 50.000 Zellen untersucht wurden. Gemessen wurde die Emission von Licht einer Wellenlänge von 520nm. Angegeben ist für alle fünf Zelllinien der Prozentsatz der Zellen, deren Fluoreszenzintensität den Faktor 3 überstiegen. In allen fünf Zelllinien entwickelte sich nach Infektion mit bhPIV3-EGFP eine hohe Grünfluoreszenz im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen

	Prozent Zellen mit erhöhter Fluoreszenz bei 520nm	
Zelllinie	nicht infiziert	mit bhPIV3-EGFP infiziert
A549	0,64	88,65
LLC-Mk2	0,01	94,4
HEp2	0,02	98,36
Jurkat	3,97	94,95
THP-1	0,86	99,1

5.6.3 Bestimmung neutralisierender Antikörper mit Hilfe des bhPIV3-EGFP

Nachdem gezeigt worden war, dass sich bhPIV3-EGFP für den fluorimetrischen Nachweis bereits geringer Virusmengen an Tag 5 p.i. eignet, wurde im Folgenden auf dieser Basis eine Vereinfachung der Titrationsmethode für neutralisierende Antikörper entwickelt und etabliert. Dabei wurde – analog zum Vorgehen bei der Bestimmung der Antikörper mit Hilfe des PRNT – eine definierte Menge Virus (200 pfu) mit seriellen Verdünnungen der zu bestimmenden Seren gemischt, präinkubiert und dann auf LLC-MK2-Zellen gegeben. Im Gegensatz zum PRNT wurde jedoch nicht hPIV3 sondern bhPIV3-EGFP verwendet. So lässt sich, ohne dass ein Plaque-Test notwendig wäre, der neutralisierende Antikörpertiter anhand der Fluoreszenzentwicklung bei 520 nm detektieren.

Die Neutralisationsansätze hatten ein Volumen von 200 µl, jeweils 100 µl Virussuspension und 100 µl seriell verdünntes Serum. Es wurden Triplikate mit 50 µl Volumen auf Vertiefungen einer konfluent mit LLC-MK2-Zellen bewachsenen 96well-Platte ausplattiert.

An Tag 5 p.i. wurden die Zellen lysiert und im Photometer vermessen (siehe Tabelle 5.2). Die Fluoreszenzwerte wurden gegen die Verdünnungsschritte aufgetragen (siehe Abbildung 5.17), so dass der Neutralisationstiter leicht abgelesen werden konnte: Je höher die Verdünnungsstufe, bei der der exponentielle Anstieg der Fluoreszenz stattfindet, desto höher der Neutralisationstiter.

Tabelle 5.2: Beispielhafte Darstellung der gemessenen Fluoreszenzwerte im Rahmen einer Bestimmung des Neutralisationstiter mittels FRNT

In Tabellenform aufgetragen ist die Verdünnung des Serums gegen die gemessene Fluoreszenzintensität bei 520 nm.

Verdünnung (log2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Wert 1	385	397	369	394	7822	20319	27631	30210	30103	35136	35001	29804
Wert 2	369	381	372	366	1596	20221	28858	31763	32606	35078	36268	32291
Wert 3	415	369	397	372	2176	26752	32200	30985	35236	36094	36189	32694

neutralisiert

Keine Neutralisation sichtbar

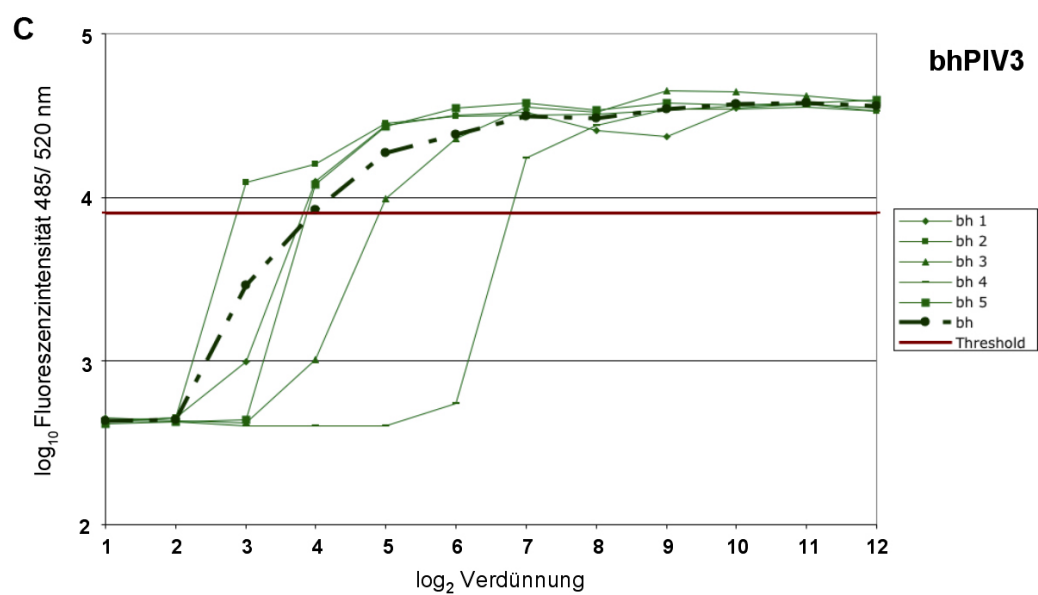
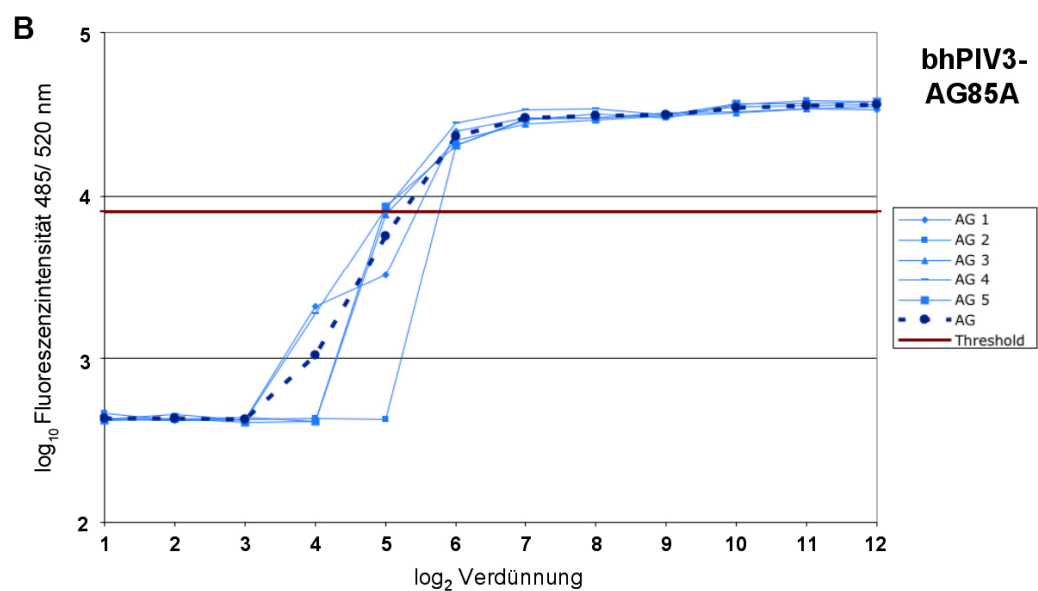
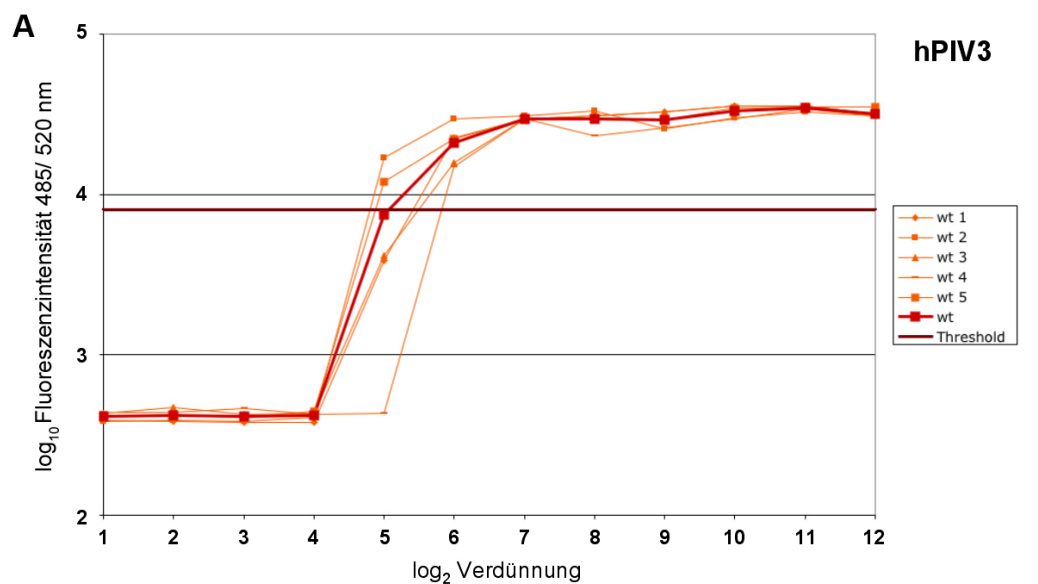
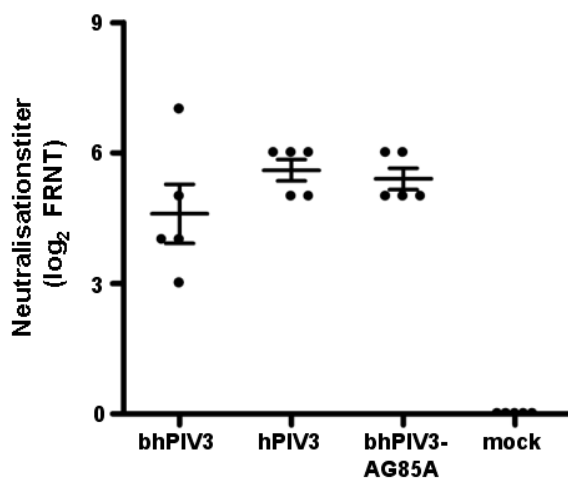


Abbildung 5.17: Bestimmung der FRNT- Neutralisationstiter mit Hilfe von bhPIV3-EGFP

Die Seren der drei bereits mit Hilfe des PRNT bezüglich ihres Neutralisationstiter untersuchten Versuchstiergruppen wurden mit Hilfe der Fluoreszenzentwicklung des bhPIV3-EGFP auf die Menge der in ihnen enthaltenen neutralisierenden Antikörper hin untersucht. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der Triplikate gegen den jeweiligen Verdünnungsschritt (\log_2). Fett gedruckte, dunklere Linien stellen jeweils den Mittelwert der fünf Einzelproben dar.

Wie im Falle des PRNT kann ein Grenzwert definiert werden, welcher für eine nicht mehr vorhandene Neutralisationswirkung überschritten werden muss und das Ergebnis für jedes einzelne Serum als ganzzahliger Wert ausgelesen werden (siehe Abbildung 5.18). Denkbar ist auch eine Bestimmung des Titer als Schnittpunktes der Verbindungslinie zwischen den einzelnen Fluoreszenzwerten mit dem Grenzwert.

**Abbildung 5.18: Auswertung des FRNT**

Abgebildet sind, ausgehend von den in der Abbildung 5.17 dargestellten Verläufen, die Schnittpunkte der Linien für die einzelnen Seren mit dem Grenzwert bei einer Fluoreszenzintensität von 8000, einem Viertel der maximalen Fluoreszenz. Dabei zeigen höhere Werte eine spätere Neutralisation und somit einen höheren Neutralisationstiter im betreffenden Serum. hPIV3 induziert einen etwas höheren Neutralisationstiter (5,6) als bhPIV3 (4,6) und bhPIV3-AG85A (5,4). Es zeigt sich wie auch im PRNT kein statistisch signifikanter Unterschied (t-Test) zwischen den drei immunisierten Gruppen. Der Versuch wurde mehrfach mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Eine Auswertung der im FRNT erhaltenen Werte (siehe Abbildung 5.18) zeigt dem PRNT ähnliche Ergebnisse: Für das bhPIV3 wurde der geringste Mittelwert festgestellt, während für das hPIV3 und das bhPIV3-AG85A höhere Werte erhalten wurden. Es konnte keine signifikante Veränderung der hervorgerufenen neutralisierenden Antikörperantwort zwischen den Versuchstiergruppen festgestellt werden.

6 Diskussion

Bei bhPIV3 handelt es sich um ein bovines Parainfluenzavirus Typ 3, dessen Oberflächenproteingene gegen jene des humanen Parainfluenzavirus Typ 3 ausgetauscht wurden. Es wurde ursprünglich hergestellt, um als Impfstoff gegen schwere hPIV3-Infektionen bei Kleinkindern und Säuglingen eingesetzt zu werden, wobei sich herausstellte, dass das Virus in Primaten den Attenuationsphänotyp des bPIV3 zeigt und trotzdem eine mit dem hPIV3 vergleichbare Antikörperantwort hervorruft [44,57]. In sich anschließenden Versuchen wurden zusätzliche offene Leseraster bzw. Geneinheiten in das bhPIV3-Genom eingebracht, um Antigene anderer viraler Krankheitserreger zu exprimieren. Diese wurden in Tierversuchen erfolgreich als Impfvektoren gegen Lungenpathogene wie das hMPV [61], das hRSV [58,59,60] oder das SARS-CoV [62,63] eingesetzt.

Mononegavirales eignen sich prinzipiell gut als Impfvektoren, da sie eine leichte und sichere Insertion weiterer Gene erlauben, die anschließend hochgradig exprimiert werden [52]. Neben der Tatsache, dass bhPIV3 in Primaten nicht pathogen ist, haben PIV3-basierte Impfvektoren zusätzlich den Vorteil, die Insertion großer Nukleotidfolgen bis zu einer Länge zu erlauben, welche der Hälfte des Wildtyp-Genoms entspricht [129]. Außerdem wächst das Virus zu hohen Titern in Zelllinien, die zur Herstellung von Impfstoffen zugelassen sind, wie z.B. der Vero-Zelllinie. Aus diesem Grund können bhPIV3-basierte Impfstoffe sehr einfach und sicher hergestellt werden, wodurch einzelne Impfdosen in der Herstellung sehr günstig werden. Im Falle einer Immunisierung gegen Pathogene, für die die Lunge als Eintrittspforte in den Wirtskörper dient, hat das bhPIV3 zusätzlich den Vorteil, dass sich das Virus in den ausdifferenzierten Epithelzellen der Lunge vermehrt, so dass neben der systemischen Immunantwort auch lokal eine protektive mukosale Immunantwort induziert wird. Der mukosalen Gabe eines Impfstoffes wird eine höhere Wirkung gegen mukosale Erreger zugeschrieben [130].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Viren handelt es sich um die ersten bhPIV3-Vektoren, die nicht-virale Antigene exprimieren. Mit ihrer Hilfe sollte die Frage geklärt werden, ob die intranasale Gabe von bhPIV3-Vektoren auch gegen nicht-virale Erreger eine protektive Immunantwort induzieren kann. Diese Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit für *M. tb.*-Infektionen prinzipiell positiv beantwortet werden, jedoch beschränkte sich die positive protektive Wirkung der rekombinanten Viren auf einen zusätzlichen Schutz-Effekt nach BCG-Gabe.

M. tb. ist im Hinblick auf die globale Morbidität und die globale Mortalität nicht nur das wichtigste bakterielle Pathogen, sondern neben HIV und *Plasmodium falciparum* auch eines

der drei wichtigsten Pathogene überhaupt bezüglich der Zahl der jährlich weltweit geforderten Todesopfer [101]. Die Wirksamkeit des BCG, des derzeit einzigen zugelassenen Impfstoffes gegen das *M. tb.*, ist im Hinblick auf den Schutz vor Lungentuberkulose umstritten [94]. Offensichtlich ist es mit diesem Impfstoff allein nicht möglich, die globale Mortalität und Morbidität effektiv zu beschränken. Im Falle der immer häufiger auftretenden Co-Infektionen mit HIV sind *M.tb.*-Infektionen nur sehr schwer beherrschbar und die zunehmende Verbreitung auch gegen Medikamente der zweiten Wahl resistenter Krankheitserreger sorgt für eine Verschärfung der Situation und gefährdet auf mittlere Sicht auch die öffentliche Gesundheit in den bisher wenig betroffenen Industriestaaten [91]. Aus diesem Grund wird der Entwicklung eines neuen, effektiveren *M. tb.*-Impfstoffes von Seiten der WHO eine hohe Priorität eingeräumt [92].

6.1 Herstellung, Überprüfung und Quantifizierung der rekombinanten Viren

Um die Versuche durchführen zu können, wurde zuerst das reverse Genetiksystm für die Herstellung rekombinanter hPIV3 etabliert. Damit ist diese Arbeit Teil eines derzeit stattfindenden Prozesses, innerhalb dessen, nach der ersten Erzeugung eines rekombinanten Mononegavirales 1994 [31], diese Technik weite Verbreitung in verschiedenen Laboratorien findet. Dabei wurde hier auf die ältere Methode zurückgegriffen, bei der die zur RNA-Transkription notwendige T7-Polymerase mit Hilfe eines MVA-T7 in der Zielzelle exprimiert wird [32].

Die Identität und die replikative Kapazität der Viren wurden überprüft, bevor diese im Tierversuch eingesetzt wurden. Für die Notwendigkeit einer Sequenzierung der eingebrachten Gene gibt es mehrere Gründe: Die rekombinanten Viren sind für eine erfolgreiche Replikation nicht auf die zusätzlich eingebrachten Gene angewiesen. Es ist im Gegenteil möglich, dass ein Virus, dessen Genom Teile der eingebrachten nicht-viralen Sequenzen durch einen Fehler der Polymerase wieder verliert, durch seine geringere Basenzahl anderen Genomen gegenüber bevorzugt repliziert wird [129]. Darüber hinaus wird in vielen Zellen im Rahmen der antiviralen Immunantwort, eine 150 kDa-Variante der dsRNA-Adenosin-Desaminase 1 (*adenosine deaminase acting on dsRNA 1*, ADAR1) induziert [131]. Enzyme dieser Familie erzeugen in den zellulären RNAs, also auch im viralen Genom, Desaminierungen von Adenosinresten, die dadurch zu Inosin-Resten werden [132]. Im viralen Genom enthaltene Inosin-Reste werden in der Replikation als Guanodin-Reste abgelesen, so dass multiple Mutationen im viralen Genom entstehen. Auch für hPIV3-Vektoren sind diese

Hypermutationen beschrieben [129]. Durch die Sequenzierung der mRNAs der eingebrachten Gene konnte nachgewiesen werden, dass es trotz mehrfacher Passagierung weder zu einer Verkürzung noch zu einer Hypermutation der Gene gekommen war. Der Nachweis der Expression der eingebrachten Gene im Western-Blot erbrachte zusätzliche Sicherheit bezüglich der Identität und der effektiven Expression der Genprodukte in diesem viralen System.

Außerdem wiesen die von den hergestellten rekombinanten Viren erreichten hohen Titer in LLC-MK2-Zellen zusammen mit der gleich bleibend kleinen Größe der Plaques der bhPIV3-Vektoren darauf hin, dass die Expression der M. tb.-Antigene durch die Viren keinen zusätzlichen cytopathischen Effekt in den Kulturzellen hervorruft.

Verschiedene Arbeitsgruppen verwenden unterschiedliche Methoden, um PIV3-Viren zu quantifizieren, wobei der Hämagglutinationstest die einfachste darstellt. Bei diesem wird die Eigenschaft der Viren, aufgrund der Bindung des Oberflächenproteins Hämagglutinin-Neuraminidase an Erythrocyten von Meerschweinchen zu binden, ausgenutzt: Wird eine ausreichende Zahl Viren mit einer Erythrocytensuspension versetzt, kommt es zur Agglutination. Dieser Test ist jedoch aufgrund der hohen Anzahl benötigter Viren nicht sehr sensitiv und weist darüber hinaus auch nicht replikationsfähige Viren nach.

Sollen infektiöse Partikel quantifiziert werden, so steht am Beginn des Nachweises eine serielle Verdünnungsreihe, deren einzelne Stufen anschließend für eine mehrtägige Infektion verwendet werden. Die Detektion kann als Endpunktbestimmung vorgenommen werden, bei der häufig wiederum Erythrocyten verwendet werden (HämadSORPTIONSTEST), deren Bindung an infizierte Zellen besser zu erkennen ist als der durch die virale Infektion hervorgerufene cytopathische Effekt. Eine sichere und schnelle, allerdings aufwendigere und teurere Alternative zur HämadSORPTION ist die Detektion infizierter Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern (Immunfluoreszenz-Färbung) [133]. Der Plaque-Test, bei dem verfestigtes Medium die Viren zur ausschließlichen Ausbreitung von Zelle zu Zelle zwingt, weshalb sich Ansammlungen infizierter Zellen bilden, die entweder durch die lytische Wirkung des Virus als Plaque genanntes Loch im Zellrasen sichtbar ist, oder aber als Plaquefärbung mit Antikörpern spezifisch angefärbt werden kann [19], stellt eine weitere Methode dar, um infektiöse Viren zu quantifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bhPIV3-Titer mit Hilfe einer Plaquefärbung bestimmt, bei der im Gegensatz zum HämadSORPTIONSTEST die Arbeit mit Blut ausschließlich für diese Versuche zusätzlich gehaltener Meerschweinchen nicht notwendig ist. Die hier zutage tretenden deutlichen Unterschiede in der Plaque-Morphologie zwischen hPIV3 und bhPIV3

(siehe Abbildung 5.2) sind bisher nicht beschrieben worden, obwohl zumindest eine Arbeit eine bhPIV3-Titration mittels Plaque-Test beschreibt [56]. Dieser Plaque-Test unterscheidet sich jedoch von der in dieser Arbeit beschriebenen Methode durch die Wahl der Kulturzellen, auf denen dieser durchgeführt wurde: Während die hier beschriebenen Plaque-Tests auf LLC-MK2-Zellen durchgeführt wurde, verwenden Haller et al. Vero-Zellen. Diese haben die Eigenschaft, defizient für Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β 1 (IFN- β 1) zu sein [134], welche von vielen Parainfluenzaviren Spezies-spezifisch durch die vom P-Gen zusätzlich kodierten Nichtstrukturproteine V und C antagonisiert werden [135,136,137]. Das bhPIV3 trägt das bovine P-Gen, während das hPIV3 das humane P-Gen trägt. Entsprechend könnte die geringe Plaque-Größe der bhPIV3-Vektoren in LLC-MK2-Zellen Ausdruck der nicht antagonisierten IFN- α - bzw. IFN- β 1-Induktion durch das bhPIV3 sein. Diese Annahme wäre zu erhärten durch einen Vergleich der Plaquegrößen der hPIV3- und bPIV3-Wildtypviren mit dem bhPIV3 in einer Auswahl verschiedenen Epithelzelllinien, welche neben LLC-MK2-Zellen und Vero-Zellen möglicherweise auch eine bovine Zelllinie enthalten sollte, und könnte sich als probater Weg erweisen, innerhalb kurzer Zeit die Antagonisierungs-Kompetenz verschiedener Parainfluenzaviren in verschiedenen Zelllinien zu überprüfen.

6.2 Die Maus als Tiermodell für bhPIV3-Immunisierungen

Wie bereits dargestellt, wurden die bisherigen Tierversuche mit bhPIV3-Viren an syrischen Goldhamstern, Rhesusaffen oder aber Meerkatzen durchgeführt. Diese sind deshalb die Tiermodelle der Wahl, weil Maus und Ratte als nicht permissiv für hPIV3 gelten.

Da diese Beobachtungen bereits vor 40 Jahren gemacht wurden, finden sich kaum aktuelle wissenschaftliche Publikationen, die das Wachstum des hPIV3 in Maus und Ratte beschreiben. Eine Ausnahme bildet eine Veröffentlichung von Minyata et al. aus dem Jahr 2005. Der dort beschriebene hPIV3-Stamm (KK24) konnte nach intranasaler Inokulation lediglich in wenigen Ratten und in keiner der infizierten Mäuse mit Hilfe eines Plaque-Tests nachgewiesen werden [138]. Aus diesem Grund wurde bisher darauf verzichtet, die Maus in Versuche mit bhPIV3 einzubeziehen, da davon ausgegangen wurde, dass bhPIV3 im Respirationstrakt ebenfalls nicht repliziert.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die ersten Versuche beschrieben, in denen Mäuse mit rekombinanten bhPIV3 infiziert wurden. Dies geschah primär, da das Mausmodell das einfachste und vielfältigste Modell ist, um sicher die Wirkung eines experimentellen anti-*M. tb.*-Impfstoffes ermitteln zu können. Es bestand die Hoffnung, dass das zu erwartende minimale Wachstum der Viren ausreichen würde, um einen Impfschutz hervorzurufen.

Die in dieser Arbeit bestimmten Titer liegen zumindest an Tag 2 wesentlich höher, als dies anhand der Daten von Miyata et al. [138] zu erwarten war. Titer von ca. 5×10^3 pfu an Tag 2 p.i. deuten auf aktive Replikation hin, obwohl ein Persistieren des Inokulums anhand des viralen Titers alleine nicht ausgeschlossen werden kann. In anderen Kleintiermodellen wurde allerdings gezeigt, dass das virale Inokulum bereits nach wenigen Stunden nicht mehr nachweisbar ist [82]. Zudem wäre die protektive Wirkung der viralen Vektoren gegenüber der *M. tb.*-Challenge nicht erklärbar, ohne dass aktive Replikation und die damit verbundene Expression mykobakterieller Antigene in der respiratorischen Mukosa stattfindet, da die zusätzlich exprimierten *M. tb.*-Antigene allenfalls in Spuren im parainfluenzaviralen Virion enthalten sind.

Die gefundene Virusmenge kann entsprechend nur auf Replikation zurückgeführt werden, ist jedoch bereits an Tag 4 deutlich eingeschränkt. Da das bhPIV3 vor allem Gene des bPIV3-Wildtypvirus trägt, ist es durchaus möglich, dass das bhPIV3 besser in Mäusen repliziert als das hPIV3-Wildtypvirus. Um diese Frage zu klären, könnte eine parallele Infektion von Balb/c-Mäusen mit bhPIV3 und hPIV3 durchgeführt werden, eventuell im Vergleich zum bPIV3-Wildtypvirus.

6.3 Impferfolg der rekombinanten viralen Vektoren gegen Tuberkulose im Mausmodell

Die Zielstellung des vorgestellten einzelnen Versuches war es, festzustellen, ob die Immunisierung mit bhPIV3-Vektoren generell einen protektiven Effekt induzieren kann. Da die Evaluation potentieller Impfstoffe gegen *M. tb.* in der Regel in mehreren Versuchen durchgeführt wird, handelt es sich bei den hier dargestellten Daten um vorläufige Ergebnisse.

Die alleinige mukosale Impfung mit rekombinanten parainfluenzaviralen Vektoren, die mykobakterielle Antigene exprimieren, induzierte in diesem Versuch keinen Schutz vor Lungentuberkulose (siehe Abbildung 5.11). Im Gegensatz dazu konnte in einigen veröffentlichten Experimenten, in denen die hier verwendeten Antigene durch DNA-Impfstoffe exprimiert wurden eine protektive Wirkung beobachtet werden [125,126,139], doch sind diese Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Impfstrategien nicht direkt miteinander vergleichbar. Dass in der Lunge der ausschließlich mit einzelnen Vektoren geimpften Tiere ein gegenüber der nicht-immunisierten Kontrollgruppe erhöhter

Bakterientiter zu beobachten ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht hinreichend erklärt werden. Spekulativ kommt neben einem zufälligen Zurückbleiben des Bakterienwachstums in den Lungen der uninfizierten Kontrolltiere in Betracht, dass die Lunge der infizierten Tiere auch noch sechs Wochen nach Gabe der bhPIV3-Vektoren geschädigt waren oder dass eine Immunpathologie induziert wurde, so dass die Tiere empfänglicher für mykobakterielle Infektionen waren. Des Weiteren kommt eine längerfristige Verschiebung der Immunantwort in Frage. Für das verwandte RSV ist eine Verschiebung der Immunantwort nach der Infektion hin zu einer T_H2 -Antwort beschrieben worden [140], wobei diese Ergebnisse jedoch umstritten sind. Wäre dies auch für bhPIV3 der Fall, so würde dies einen Erklärungsansatz bieten, da die T_H1 -Antwort essentiell für eine Bekämpfung der *M. tb*-Infektion ist. Allerdings existieren diesbezüglich für hPIV3 keine entsprechenden Daten.

Bezüglich der systemischen Tuberkulose, für welche die Bakterienlast in der Milz als Korrelat gilt, ist zumindest bhPIV3-AG85A in der Lage, den Bakterientiter verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe zu senken (siehe Abbildung 5.12). Der induzierte Schutzeffekt erreicht jedoch nicht den Schutzeffekt des BCG. BCG zeigte sich auch in diesem Versuch hochprotektiv im Hinblick auf die systemische Streuung der Mykobakterien und hämatogene Organmanifestationen.

Für die Immunisierung nach BCG-Gabe zeigt sich in diesem Versuch ein grundsätzlich anderes Bild. Eine *Boost*-Immunisierung mit bhPIV3-Cfp10, mit bhPIV3-AG85A oder mit bhPIV3-Rv3407 führt zu einer signifikanten Reduktion der mykobakteriellen Besiedlung der Lunge nach Provokation mit *M. tb*. (siehe Abbildung 5.13). Besonders erfolgreich ist dabei ein *Boost* mit bhPIV3-cfp10. Dieser Vektor induziert in der Lunge eine über den BCG-Effekt hinausgehende Reduktion der *M. tb*-Last um den Faktor 60. Sogar in der Milz, die durch BCG bereits relativ gut geschützt wird, ist ein - allerdings nicht signifikanter – additiver protektiver Effekt zu erkennen. Auch die *Boost*-Impfung mit bhPIV3-AG85A und mit bhPIV3-Rv3407 vermittelt einen über die Wirkung von BCG hinausgehenden protektiven Effekt. Während der durch bhPIV3-HspX induzierte protektive Effekt durch die hohe Streuung der Endpunkte schwer einschätzbar ist, ist nach Applikation von bhPIV3-Mtb8.4 kein Schutzeffekt zu beobachten.

Der Verzicht auf eine erst mit BCG und anschließend mit leerem bhPIV3-Vektor immunisierte Kontrollgruppe stellt dabei eine Schwäche des experimentellen Designs dar. Ein Mitführen dieser vierten Kontrollgruppe hätte die Interpretation der vorliegenden Daten sicher

erleichtert, da sie eine Einschätzung der unspezifischen Vektoreffekte auf die BCG-immunisierten Tiere mit größerer Sicherheit erlaubt hat. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich eine starke Wirkung des Vektors nur aufgrund der sehr unterschiedlichen Schutzwirkung der verschiedenen Impfvektoren ausschließen, insbesondere aufgrund der fehlenden positiven Wirkung des bhPIV3-Mtb8.4-Vektors. Da Mtb8.4 in anderen Impfstrategien als protektives Antigen beschrieben wurde, ist es unwahrscheinlich, dass der leere Vektor einen signifikanten unspezifischen Schutzeffekt ausübt. Ansonsten müsste davon ausgegangen werden, dass die zusätzliche Expression von Mtb8.4 die Schutzwirkung aufhebt. Entsprechend unwahrscheinlich ist ein unspezifischer protektiver Effekt durch den leeren Vektor in der Größenordnung der Reduktion der Bakterienlast durch bhPIV3-cfp10, bhPIV3-AG85A und bhPIV3-Rv3407 in der Lunge. Als weiteres Caveat in der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die BCG-Immunisierung in diesem Versuch eine im Vergleich zu anderen Tierversuchen schwache protektive Wirkung zeigte [112,116,126]. Es ist somit möglich, dass der durch die bhPIV3-Vektoren hervorgerufene protektive Effekt gegen Lungentuberkulose in Balb/c-Mäusen aufgrund des eingeschränkten protektiven Effekts der BCG-Immunisierung besonders stark zu Tage tritt.

Die Schutzwirkung der mukosalen Expression von Cfp10 und Rv3407 durch bhPIV3-Vektoren kann nicht auf einen klassischen *Boosteffekt* zurückgeführt werden, bei dem die Steigerung der Wirkung dadurch eintritt, dass bereits geprimte Immunzellen einen weiteren identischen Stimulus erhalten und dadurch rasch expandieren. Da Cfp10 als RD1-Protein im Genom des BCG deletiert ist, ist ein verbesserter Schutz durch eine primäre Cfp10-spezifische Immunantwort anzunehmen. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für Rv3407 im Rahmen einer DNA-Immunisierung beschrieben [126]. Diese beiden Ergebnisse widersprechen der Hypothese, dass für als BCG-Ergänzung verwendete *M. tb.*-Impfstoffe, welche Untereinheiten des *M. tb.* exprimieren, ausschließlich Antigene verwendet werden können, die auch im BCG exprimiert werden [28].

Obwohl bhPIV3-Cfp10 in diesem Versuch den eindruckvollsten Schutzeffekt induzierte, haben Vektoren wie bhPIV3-AG85A und bhPIV3-Rv3407 gegenüber bhPIV3-Cfp10 den Vorteil, dass AG85A und Rv3407 nicht den hohen diagnostischen Wert des Cfp10 besitzen. Da anhand der starken T-Zell-Antigene ESAT-6 und Cfp10 erfolgreich geklärt werden kann, ob ein Individuum mit BCG oder aber mit *M. tb.* in Kontakt gekommen ist [121], herrscht eine große Scheu, eines dieser Antigene als Impfantigen zu verwenden. Um diese zu überwinden, müsste eindeutig nachgewiesen werden, dass eines dieser Antigene unverzichtbar für die Entwicklung eines protektiven Impfstoffs ist.

Jeder neue experimentelle Impfstoff gegen *M. tb.* muss im Kontext der vielen anderen Impfversuche gesehen werden. Die bhPIV3-Vektoren sollten ob der Ähnlichkeit der Ansätze dabei zuerst mit dem Erfolg des MVA-AG85A verglichen werden. Auch bei diesem handelt es sich um einen viralen Vektor, welcher zusätzlich ein Antigen des *M. tb.* exprimiert. Bei MVA handelt es sich jedoch um ein attenuiertes Vakziniavirus, welches sich mit wenigen Ausnahmen in eukaryotischen Zellen nicht vermehren kann. MVA hat gegenüber dem bhPIV3 den Vorteil, bereits seit Jahren als Impfstoff gegen die Pocken eingesetzt worden zu sein, während bhPIV3 noch nicht als Impfstoff zugelassen ist. Auf der anderen Seite repliziert bhPIV3 im Lungenepithel, während das MVA sich nicht vermehrt und intradermal gegeben wird. Dies könnte sich als Vorteil für den bhPIV3-Vektor herausstellen.

MVA-AG85A wird derzeit in klinischen Phase II Studien getestet [104], nachdem es in der Phase I nach alleiniger Gabe eine vorübergehende und als Boost-Impfstoff nach BCG-Immunisierung eine anhaltende signifikante Erhöhung der AG85A-spezifischen T-Zellen zeigte [114].

In zuvor veröffentlichten Versuchen hatte eine Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit MVA-AG85A zweiundzwanzig Wochen nach BCG-Gabe gezeigt, dass sechs Wochen nach Infektion mit 250 cfu *M. tb.* der mykobakterielle Titer in der Lunge der immunisierten Tiere um den Faktor 500 und in der Milz um den Faktor 50 niedriger war, verglichen mit nicht immunisierten Mäusen [112]. Die mit BCG/bhPIV3-cfp10 erhaltenen Ergebnisse fallen ähnlich aus: Ist die Reduktion in der Lunge um den Faktor 100 reduziert, so ist in der Milz kein einziges Bakterium nachzuweisen. Wird dies als der halben Nachweisgrenze entsprechender Titer interpretiert, so entspricht dies einer Reduktion um den Faktor 70.

Während der Erstellung dieser Dissertation, wurde ein zweiter, ausschließlich von Mitarbeitern des MPI durchgeführter Versuch zur Evaluierung der bhPIV3-Vektoren durchgeführt und ausgewertet. In diesem zweiten Versuch, in dem die Virusreplikation nicht bestimmt wurde, aber eine T-Zell-Antwort indirekt auf aktive Virusvermehrung hinweist, konnten die Daten des ersten Versuches nicht bestätigt werden, so dass weitere Versuche notwendig sind, um die Schutzwirkung der Viren endgültig zu klären.

In diesem Zusammenhang könnte es hilfreich sein, weitere Versuche an Meerschweinchen durchzuführen, da das Meerschweinchenmodell als das stringendere angesehen wird. Interessant wäre es, einen *Boost*-Versuch nach BCG-Gabe durchzuführen, bei dem die hier verwendeten Antigene in verschiedenen Systemen exprimiert werden. Im Vergleich zu den hier verwendeten Vektoren könnten MVA-Vektoren verwendet werden, welche Cfp10,

AG85A, Rv3407 und vielleicht auch Mtb8.4 exprimieren, oder es könnte mit DNA-Plasmiden immunisiert werden. So könnte zwischen der Vektorwirkung und der Antigenwirkung unterschieden werden und divergente Ergebnisse wie im Falle der Mtb8.4-Expression interpretiert werden.

Die Frage, ob bhPIV3-Vektoren als Impfvektoren gegen mykobakterielle und andere nicht-virale Infektionen geeignet sind, ist damit weiterhin offen. Deutlich ist jedoch, dass die Induktion einer protektiven Immunantwort gegen persistente intrazelluläre Erreger schwieriger zu erreichen ist, als die Immunisierung gegen akute virale Infektionen.

6.4 Die Baumwollratte als Tiermodell für bhPIV3-Infektionen

Mehrfach wurde beschrieben, dass Baumwollratten für hPIV3 permissiv sind. Die publizierten TCID₅₀-Titer in der Lunge erreichten an den Tagen 2 bis 5 durchgehend zwischen 10⁵ und 10⁶ Viren pro Gramm Gewebe [80,83]. Aufgrund der guten Replikation des hPIV3 in der Lunge der Baumwollratte, stellte sich die Frage, ob diese auch ein mögliches Modell für bhPIV3 darstellt. Dass Baumwollratten vor kurzem als ein weiteres Tiermodell für *M. tb.*-Infektionen beschrieben wurden, weckte weiteres Interesse für bhPIV3-Verusche in dieser Tierart [77].

Die in dieser Arbeit bestimmten hPIV3-Titer lagen an Tag 3 p.i. bei circa 10⁴ pfu Viren pro Gramm Gewebe. Gleichzeitig zeigte sich für beide bhPIV3-Vektoren eine hochgeradige Attenuierung, da die gefundenen 40 pfu Viren pro Gramm Lunge eine Restriktion der Replikation um den Faktor 250 darstellen. Da bhPIV3 in der Lunge von Rhesusaffen und Baumwollratten lediglich um den Faktor 10 attenuiert ist [44,56], stellt somit die Baumwollratte das Tiermodell dar, in welchem die bhPIV3-Replikation in der Lunge am weitesten hinter hPIV3 zurückbleibt.

Die Baumwollratte stellt also kein Modell für maximales Viruswachstum dar, kann jedoch eventuell als Attenuierungsmodell einer minimalen bhPIV3-Replikation eingesetzt werden. Dies ist vor allem deshalb interessant, da bislang unklar ist, wie stark der Attenuierungsphänotyp in seronegativen Kleinkindern ausfällt, und ob er eher dem für Rhesusaffen beschriebenen Phänotyp (Restriktion um den Faktor 10) oder dem hier für Baumwollratten festgestellten Phänotyp (Restriktion um den Faktor 250) entspricht. Klinische Studien in seronegativen Kleinkindern sollen Ende 2007 oder Anfang 2008 abgeschlossen werden (persönliche Mitteilung, Dr. Brian Murphy, NIH), sodass eine Validierung des einen oder anderen Modells möglich erscheint.

Vor diesem Hintergrund sind die hier erhaltenen Daten bezüglich der Antikörperantwort im

Falle einer sehr geringen Vermehrung ermutigend. Obwohl die bhPIV3-Replikation um den Faktor 250 geringer ist, liegen die in diesem Versuch bestimmten durch bhPIV3 induzierten neutralisierenden Antikörpertiter lediglich um den Faktor zwei unterhalb der durch hPIV3 induzierten Antikörperantwort. Auch konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Expression von bakteriellen Antigenen keine negative Auswirkung auf die Antwort an neutralisierenden Antikörpern hat. Dies lässt zusätzlich hoffen, dass ein eventueller Impfstoff gegen *M. tb.* auf Basis des bhPIV3 das immunisierte Individuum auch gegen das hPIV3 schützt.

6.5 Das bhPIV3-EGFP und seine Anwendung im FRNT

Es wurde bereits eine Reihe von EGFP-exprimierenden *Mononegavirales* hergestellt und charakterisiert. Unter anderem wurden diese Konstrukte benutzt, um Manipulationen des Virusgenoms und die erfolgreiche Integration eines zusätzlichen Gens grundsätzlich nachzuweisen (z.B. [141]). Für das EGFP spricht dabei, dass es sich einfach und auf verschiedene Arten detektieren lässt, so dass innerhalb kurzer Zeit über Erfolg oder Nichterfolg der Herstellung des Virus entschieden werden kann. Des Weiteren werden EGFP-exprimierende Viren eingesetzt, um biologische Fragestellungen zur viralen Pathogenese oder dem viralen Tropismus zu beantworten (z.B. [142]). Durchflusszytometrische Messungen können diesen Prozess sehr vereinfachen, wobei zusätzliche Oberflächenmarker eine nähere Bestimmung der befallenen Zellen ermöglichen [143]. Für das Nipah-Virus konnte so die Abhängigkeit des Tropismus von der Expression des Oberflächenproteins Ephrin B2 bestätigt werden [144].

Bei dem putativen Rezeptor für hPIV3 hingegen handelt es sich um Sialinsäure-haltige Zuckerstrukturen, welche von einer Vielzahl von Proteinen getragen werden. Aus diesem Grund kann das Virus *in vitro* in eine Vielzahl tierischer Zellen gelangen, weshalb das hPIV3 ein sehr großes Spektrum an potentiellen Wirtszellen aufweist. Allerdings ist das erfolgreiche Eindringen des Virus nicht mit produktiver Replikation gleichzusetzen. Aufgrund der hPIV3-Oberflächenproteine sollte bhPIV3 den gleichen Tropismus aufweisen wie das hPIV3. Entsprechend bieten die in der Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse keine Überraschung. Es zeigte sich im Durchflusszytometer, dass bhPIV3 nicht nur die Epithelzelllinien LLC-MK2, HEp-2 oder A549 infiziert, sondern auch die humanen Immunzelllinien THP-1 und Jurkat. Die Infektion von Immunzellen ist sowohl für hPIV3 [145,146] als auch für bPIV3 [147] beschrieben, wobei allerdings nicht endgültig gesichert ist, ob dies *in vivo* eine Bedeutung hat. Für *in vitro*-Stimulationen von PBMCs hingegen können aufgrund der Infektion unterschiedliche Ergebnisse für lebende und UV-inaktivierte

Viren erhalten werden [147].

Der Umstand an Tag 5 nach der Infektion anhand der Fluoreszenzentwicklung sicher unterscheiden zu können, ob sich 45 pfu Viren oder deutlich weniger infektiöse Partikel in dem ursprünglichen Infektions-Ansatz befanden (siehe Abbildung 5.16), eröffnete die Möglichkeit, bhPIV3-EGFP zur Bestimmung des Titers der neutralisierenden Antikörper einzusetzen. In Anlehnung an den Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) wird dieser Test in der vorliegenden Arbeit als *Fluoreszenz-Reduktions-Neutralisations-Test* (FRNT) bezeichnet. Der Nachweis der Viren in den einzelnen Vertiefungen durch Plaque-Test wird hier ersetzt durch eine Messung der Fluoreszenz im Fluorometer. Stallwood et al. stellten im Jahr 2000 eine entsprechende Methode für Adenoviren vor [148]. 2005 und im Juni 2007 wurden sehr ähnliche Assays veröffentlicht für die Bestimmung von Antikörpern, die das Metapneumovirus- bzw. das Masernvirus neutralisieren [149,150].

Der FRNT stellt eine ernsthafte Alternative zum PRNT dar. Im Vergleich zu der herkömmlichen Methode kommt er ohne tierisches Material, wie z.B. rote Blutkörperchen aus und ist aufgrund dessen, dass keine Reagenzien wie Antikörper benötigt werden, günstiger als die Plaquefärbung. Durch die schnelle Messung am Fluorometer ist der Test zeitsparend und umgeht die subjektive Begutachtung der Testplatten. Die Werte können bei standardisierter Plattenbelegung anschließend sehr einfach in eine Auswertung überführt werden.

Eine weitere Qualität gewinnt der hier verwendete Assay durch die Verwendung von Viren, deren Oberflächenproteine ursprünglich aus einem anderen Virus stammen. Die Herstellung rekombinanter Viren, welche nicht nur grün fluoreszieren sondern auch die Oberfläche eines anderen Virus tragen, könnte zu einer Technik werden, um Neutralisationstiter für Antikörper gegen Viren zu bestimmen, die ansonsten nur schwer nachweisbar sind, sei es aufgrund mangelnden cytopathischen Effekts, sei es aufgrund hoher Pathogenität.

Auch ist vorstellbar, zwei Viren, welche fluoreszierende Proteine unterschiedlicher Farben exprimieren im selben Ansatz zu verwenden, um bei kreuzneutralisierenden Virusspezies anhand der Verschiebung der Fluoreszenz-Ratio Informationen über das die Antikörperantwort hervorrufende Virus zu erhalten.

Literaturverzeichnis

- [1] Flint S.J.[Hrsg.] (2000): Foundations of Virology, Principles of virology , American Society of Microbiology, Washington.
- [2] Henderson, D. A und Moss, B. (1999): Smallpox and Vaccinia, Plotkin, S. A und Orenstein, W. A., Vaccines , 3. Auflage, Saunders, Philadelphia.
- [3] Plotkin, S. L. und Plotkin, S. A (1999): A Short History of Vaccination, Plotkin, S. A und Orenstein, W. A., Vaccines , 3. Auflage, Saunders, Philadelphia.
- [4] Flint S.J.[Hrsg.] (2000): Virus Structure, Flint S.J., Principles of virology , American Society of Microbiology, Washington.
- [5] Modrow, S. und Falke, D. (1998): Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
- [6] Lustig, A. und Levine, A. J. (1992): 100 Years of Virology, Journal of Virology 66 [8], Seite 4629-4631.
- [7] ICTVdB Management (2007): *Mononegavirales*, www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB/01.html, Rev. 06.05.2007
- [8] Pringle, C. R. (1991): The Order Mononegavirales, Archives of Virology 117 [1-2], Seite 137-140.
- [9] Pringle, C. R. (1997): The Order Mononegavirales - current status, Archives of Virology 142 [11], Seite 2321-2326.
- [10] Tran, K. C.; Collins, P. L. und Teng, M. N. (2004): Effects of altering the transcription termination signals of respiratory syncytial virus on viral gene expression and growth in vitro and in vivo, Journal of Virology 78 [2], Seite 692-699.
- [11] Rose J.K.; J.K. und Whitt M.A. (2001): Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication, Fields B.N; Knipe D.M. und Howley P.M., Fundamental Virology , 4. Auflage, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- [12] Feldmann, H. und Kiley, M. P. (1999): Classification, structure, and replication of filoviruses, Current topics in microbiology and immunology 235, Seite 1-21.
- [13] Lamb R.A. und Kolakofsky D. (2001): Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication, Fields B.N; Knipe D.M. und Howley P.M., Fields Virology , 4. Auflage, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- [14] Hornig, M.; Brieese, T. und Lipkin, W. I. (2003): Borna disease virus, Journal of Neurovirology 9 [2], Seite 259-273.
- [15] Brieese, T.; Delatorre, J. C.; Lewis, A.; Ludwig, H. und Lipkin, W. I. (1992): Borna Disease Virus, A Negative-Strand Rna Virus, Transcribes in the Nucleus of Infected-Cells, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89 [23], Seite 11486-11489.
- [16] Brieese, T.; Schneemann, A.; Lewis, A. J.; Park, Y. S.; Kim, S.; Ludwig, H. und Lipkin, W. I. (1994): Genomic Organization of Borna-Disease Virus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91 [10], Seite 4362-4366.
- [17] Chanock, R. M.; Murphy, B. R. und Collins, P. L. (2001): Parainfluenza Viruses, Fields B.N; Knipe D.M. und Howley P.M., Fields Virology , 4. Auflage, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- [18] Kolakofsky, D.; Roux, L.; Garcin, D. und Ruigrok, R. W. H. (2005): Paramyxovirus mRNA editing, the 'rule of six' and error catastrophe: a hypothesis, Journal of General Virology 86 [4], Seite 1869-1877.
- [19] Henrickson, K. J. (2003): Parainfluenza viruses, Clinical Microbiology Reviews 16 [2], Seite 242-264.
- [20] Murphy, B. R.; Prince, G. A.; Collins, P. L.; Coelingh, K. V.; Olmsted, R. A.; Spriggs, M. K.; Parrott, R. H.; Kim, H. W.; Brandt, C. D. und Chanock, R. M. (1988): Current Approaches

to the Development of Vaccines Effective Against Para-Influenza and Respiratory Syncytial Viruses, *Virus Research* 11 [1], Seite 1-15.

[21] Lee, M. S.; Walker, R. E. und Mendelman, P. M. (2005): Medical burden of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 infection among US children. Implications for design of vaccine trials, *Hum.Vaccin.* 1 [1], Seite 6-11.

[22] Bailly, J. E.; McAuliffe, J. M.; Skiadopoulos, M. H.; Collins, P. L. und Murphy, B. R. (2000): Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates, *Virus Genes* 20 [2], Seite 173-182.

[23] Karron, R. A.; Wright, P. F.; Hall, S. L.; Makhene, M.; Thompson, J.; Burns, B. A.; Tollefson, S.; Steinhoff, M. C.; Wilson, M. H.; Harris, D. O.; Clements, M. L. und Murphy, B. R. (1995): A Live Attenuated Bovine Parainfluenza Virus Type-3 Vaccine Is Safe, Infectious, Immunogenic, and Phenotypically Stable in Infants and Children, *Journal of Infectious Diseases* 171 [5], Seite 1107-1114.

[24] Lee, M. S.; Greenberg, D. P.; Yeh, S. H.; Yogev, R.; Reisinger, K. S.; Ward, J. I.; Blatter, M. M.; Cho, I.; Holmes, S. J.; Cordova, J. M.; August, M. J.; Chen, W.; Mehta, H. B.; Coelingh, K. L. und Mendelman, P. M. (2001): Antibody responses to bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccination and human PIV3 infection in young infants, *Journal of Infectious Diseases* 184 [7], Seite 909-913.

[25] Nagai, Y. (1999): Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding, *Reviews in Medical Virology* 9 [2], Seite 83-99.

[26] Young, L. S.; Searle, P. F.; Onion, D. und Mautner, V. (2006): Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application, *Journal of Pathology* 208 [2], Seite 299-318.

[27] Brochier, B.; Kieny, M. P.; Costy, F.; Coppens, P.; Bauduin, B.; Lecocq, J. P.; Languet, B.; Chappuis, G.; Desmettre, P.; Afiademanyo, K.; Libois, R. und Pastoret, P. P. (1991): Large-Scale Eradication of Rabies Using Recombinant Vaccinia Rabies Vaccine, *Nature* 354 [6354], Seite 520-522.

[28] McShane, H.; Pathan, A. A.; Sander, C. R.; Goonetilleke, N. P.; Fletcher, H. A. und Hill, A. V. S. (2005): Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials, *Tuberculosis* 85 [1-2], Seite 47-52.

[29] Racaniello, V. R. und Baltimore, D. (1981): Cloned Poliovirus Complementary-Dna Is Infectious in Mammalian-Cells, *Science* 214 [4523], Seite 916-919.

[30] Taniguchi, T.; Palmieri, M. und Weissmann, C. (1978): Q-Beta Dna-Containing Hybrid Plasmids Giving Rise to Q-Beta Phage Formation in Bacterial Host, *Nature* 274 [5668], Seite 223-228.

[31] Schnell, M. J.; Mebatsion, T. und Conzelmann, K. K. (1994): Infectious Rabies Viruses from Cloned Cdna, *Embo Journal* 13 [18], Seite 4195-4203.

[32] Conzelmann, K. K. (2004): Reverse genetics of Mononegavirales, *Current topics in microbiology and immunology* 283, Seite 1-41.

[33] Lawson, N. D.; Stillman, E. A.; Whitt, M. A. und Rose, J. K. (1995): Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses from Dna, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 [10], Seite 4477-4481.

[34] Whelan, S. P. J.; Ball, L. A.; Barr, J. N. und Wertz, G. T. W. (1995): Efficient Recovery of Infectious Vesicular Stomatitis-Virus Entirely from Cdna Clones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 [18], Seite 8388-8392.

[35] Garcin, D.; Pelet, T.; Calain, P.; Roux, L.; Curran, J. und Kolakofsky, D. (1995): A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: Generation of a novel copy-back nondefective interfering virus, *Embo Journal* 14 [24], Seite 6087-6094.

- [36] Radecke, F.; Spielhofer, P.; Schneider, H.; Kaelin, K.; Huber, M.; Dotsch, C.; Christiansen, G. und Billeter, M. A. (1995): Rescue of Measles Viruses from Cloned Dna, *Embo Journal* 14 [23], Seite 5773-5784.
- [37] Collins, P. L.; Hill, M. G.; Camargo, E.; Grosfeld, H.; Chanock, R. M. und Murphy, B. R. (1995): Production of Infectious Human Respiratory Syncytial Virus from Cloned Cdna Confirms An Essential Role for the Transcription Elongation-Factor from the 5'-Proximal Open Reading Frame of the M2 Messenger-Rna in Gene-Expression and Provides A Capability for Vaccine Development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 [25], Seite 11563-11567.
- [38] Durbin, A. P.; Hall, S. L.; Siew, J. W.; Whitehead, S. S.; Collins, P. L. und Murphy, B. R. (1997): Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA, *Virology* 235 [2], Seite 323-332.
- [39] Hoffman, M. A. und Banerjee, A. K. (1997): An infectious clone of human parainfluenza virus type 3, *Journal of Virology* 71 [6], Seite 4272-4277.
- [40] He, B.; Paterson, R. G.; Ward, C. D. und Lamb, R. A. (1997): Recovery of infectious SV5 from cloned DNA and expression of a foreign gene, *Virology* 237 [2], Seite 249-260.
- [41] Baron, M. D. und Barrett, T. (1997): Rescue of Rinderpest virus from cloned cDNA, *Journal of Virology* 71 [2], Seite 1265-1271.
- [42] Peeters, B. P. H.; de Leeuw, O. S.; Koch, G. und Gielkens, A. L. J. (1999): Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence, *Journal of Virology* 73 [6], Seite 5001-5009.
- [43] Buchholz, U. J.; Finke, S. und Conzelmann, K. K. (1999): Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter, *Journal of Virology* 73 [1], Seite 251-259.
- [44] Schmidt, A. C.; McAuliffe, J. M.; Huang, A.; Surman, S. R.; Bailly, J. E.; Elkins, W. R.; Collins, P. L.; Murphy, B. R. und Skiadopoulos, M. H. (2000): Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates, *Journal of Virology* 74 [19], Seite 8922-8929.
- [45] Volchkov, V. E.; Volchkova, V. A.; Muhlberger, E.; Kolesnikova, L. V.; Weik, M.; Dolnik, O. und Klenk, H. D. (2001): Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity, *Science* 291 [5510], Seite 1965-1969.
- [46] Schneider, U.; Schwemmle, M. und Staeheli, P. (2005): Genome trimming: A unique strategy for replication control employed by Borna disease virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 [9], Seite 3441-3446.
- [47] Enterlein, S.; Volchkov, V.; Weik, M.; Kolesnikova, L.; Volchkova, V.; Klenk, H. D. und Muhlberger, E. (2006): Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30, *Journal of Virology* 80 [2], Seite 1038-1043.
- [48] Fuerst, T. R.; Niles, E. G.; Studier, F. W. und Moss, B. (1986): Eukaryotic Transient-Expression System Based on Recombinant Vaccinia Virus That Synthesizes Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 [21], Seite 8122-8126.
- [49] Sutter, G. und Moss, B. (1992): Nonreplicating Vaccinia Vector Efficiently Expresses Recombinant Genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 [22], Seite 10847-10851.
- [50] Wyatt, L. S.; Moss, B. und Rozenblatt, S. (1995): Replication-Deficient Vaccinia Virus Encoding Bacteriophage T7 Rna-Polymerase for Transient Gene-Expression in Mammalian-Cells, *Virology* 210 [1], Seite 202-205.
- [51] Carroll, M. W. und Moss, B. (1997): Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: Propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line, *Virology* 238 [2], Seite 198-211.

- [52] Bukreyev, A.; Skiadopoulos, M. H.; Murphy, B. R. und Collins, P. L. (2006): Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors, *Journal of Virology* 80 [21], Seite 10293-10306.
- [53] Martin, A.; Staeheli, P. und Schneider, U. (2006): RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the Mononegavirales independently of the site of viral genome replication, *Journal of Virology* 80 [12], Seite 5708-5715.
- [54] Witko, S. E.; Kotash, C. S.; Nowak, R. M.; Johnson, J. E.; Boutilier, L. A. C.; Melville, K. J.; Heron, S. G.; Clarke, D. K.; Abramovitz, A. S.; Hendry, R. M.; Sidhu, M. S.; Udern, S. A. und Parks, C. L. (2006): An efficient helper-virus-free method for rescue of recombinant paramyxoviruses and rhadoviruses from a cell line suitable for vaccine development, *Journal of Virological Methods* 135 [1], Seite 91-101.
- [55] Belshe, R. B.; Newman, F. K.; Tsai, T. F.; Karron, R. A.; Reisinger, K.; Robertson, D.; Marshall, H.; Schwartz, R.; King, J.; Henderson, F. W.; Rodriguez, W.; Severs, J. M.; Wright, P. F.; Keyserling, H.; Weinberg, G. A.; Bromberg, K.; Loh, R.; Sly, P.; McIntyre, P.; Ziegler, J. B.; Hackell, J.; Deatly, A.; Georgiu, A.; Paschalis, M.; Wu, S. L.; Tatem, J. M.; Murphy, B. und Anderson, E. (2004): Phase 2 evaluation of parainfluenza type 3 cold passage mutant 45 live attenuated vaccine in healthy children 6-18 months old, *Journal of Infectious Diseases* 189 [3], Seite 462-470.
- [56] Haller, A. A.; Miller, T.; Mitiku, M. und Coelingh, K. (2000): Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector, *Journal of Virology* 74 [24], Seite 11626-11635.
- [57] Pennathur, S.; Haller, A. A.; MacPhail, M.; Rizzi, T.; Kaderi, S.; Fernandes, F.; Bicha, L.; Schickli, J. H.; Tang, R. S.; Chen, W.; Nguyen, N.; Mathie, S.; Mehta, H. und Coelingh, K. L. (2003): Evaluation of attenuation, immunogenicity and efficacy of a bovine parainfluenza virus type 3 (PIV-3) vaccine and a recombinant chimeric bovine/human PIV-3 vaccine vector in rhesus monkeys, *Journal of General Virology* 84 [12], Seite 3253-3261.
- [58] Schmidt, A. C.; McAuliffe, J. M.; Murphy, B. R. und Collins, P. L. (2001): Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3, *Journal of Virology* 75 [10], Seite 4594-4603.
- [59] Schmidt, A. C.; Wenzke, D. R.; McAuliffe, J. M.; St Claire, M.; Elkins, W. R.; Murphy, B. R. und Collins, P. L. (2002): Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone, *Journal of Virology* 76 [3], Seite 1089-1099.
- [60] Tang, R. S.; MacPhail, M.; Schickli, J. H.; Kaur, J.; Lawlor, H. A.; Guzzetta, J. M.; Spaete, R. R. und Haller, A. A. (2004): Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) protein of respiratory syncytial virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys, *Journal of Virology* 78 [20], Seite 11198-11207.
- [61] Tang, R. S.; Schickli, J. H.; MacPhail, M.; Fernandes, F.; Bicha, L.; Spaete, J.; Fouchier, R. A. M.; Osterhaus, A. D. M. E.; Spaete, R. und Haller, A. A. (2003): Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity, *Journal of Virology* 77 [20], Seite 10819-10828.
- [62] Buchholz, U. J.; Bukreyev, A.; Yang, L.; Lamirande, E. W.; Murphy, B. R.; Subbarao, K. und Collins, P. L. (2004): Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 [26], Seite 9804-9809.
- [63] Bukreyev, A.; Lamirande, E. W.; Buchholz, U. J.; Vogel, L. N.; Elkins, W. R.; St Claire, M.; Murphy, B. R.; Subbarao, K. und Collins, P. L. (2004): Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the

SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS, Lancet 363 [9427], Seite 2122-2127.

[64] Johnson, F. H.; Gershman, L. C.; Waters, J. R.; Reynolds, G. T.; Saiga, Y. und Shimomura, O. (1962): Quantum Efficiency of Cypridina Luminescence, with A Note on That of Aequorea, Journal of Cellular and Comparative Physiology 60 [1], Seite 85-103.

[65] Shimomura, O.; Johnson, F. H. und Saiga, Y. (1962): Extraction, Purification and Properties of Aequorin, A Bioluminescent Protein from Luminous Hydromedusan, Aequorea, Journal of Cellular and Comparative Physiology 59 [3], Seite 223-239.

[66] Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G. und Cormier, M. J. (1992): Primary Structure of the Aequorea-Victoria Green-Fluorescent Protein, Gene 111 [2], Seite 229-233.

[67] Inouye, S. und Tsuji, F. I. (1994): Aequorea Green Fluorescent Protein - Expression of the Gene and Fluorescence Characteristics of the Recombinant Protein, Febs Letters 341 [2-3], Seite 277-280.

[68] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994): Green Fluorescent Protein As A Marker for Gene-Expression, Science 263 [5148], Seite 802-805.

[69] Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A. und Tsien, R. Y. (1995): Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins, Trends in Biochemical Sciences 20 [11], Seite 448-455.

[70] Tsien, R. Y. (1998): The green fluorescent protein, Annual Review of Biochemistry 67, Seite 509-544.

[71] Baulcombe, D. C.; Chapman, S. und Cruz, S. S. (1995): Jellyfish Green Fluorescent Protein As A Reporter for Virus-Infections, Plant Journal 7 [6], Seite 1045-1053.

[72] Yang, T. T.; Cheng, L. Z. und Kain, S. R. (1996): Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein, Nucleic Acids Research 24 [22], Seite 4592-4593.

[73] Integrated taxonomic information system [ITIS (2004)]: www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=180346, Rev. 06.05.2007

[74] Niewiesk, S. und Prince, G. (2002): Diversifying animal models: the use of hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) in infectious diseases, Laboratory Animals 36 [4], Seite 357-372.

[75] Blanco, J. C. G.; Pletneva, L.; Boukhvalova, M.; Richardson, J. Y.; Harris, K. A. und Prince, G. A. (2004): The cotton rat: An underutilized animal model for human infectious diseases can now be exploited using specific reagents to cytokines, chemokines, and interferons, Journal of Interferon and Cytokine Research 24 [1], Seite 21-28.

[76] Armstrong, C. (1939): The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern cotton rat *Sigmodon hispidus*., Public Health Report 54, Seite 1719-1721.

[77] Elwood, R. L.; Wilson, S.; Blanco, J. C. G.; Yim, K.; Pletneva, L.; Nikonenko, B.; Samala, R.; Joshi, S.; Hemming, V. G. und Trucksis, M. (2007): The American cotton rat: A novel model for pulmonary tuberculosis, Tuberculosis 87 [2], Seite 145-154.

[78] Kumagai, T.; Wong, D. T. und Ogra, P. L. (1985): Development of Cell-Mediated Cytotoxic Activity in the Respiratory-Tract After Experimental-Infection with Respiratory Syncytial Virus, Clinical and Experimental Immunology 61 [2], Seite 351-359.

[79] Williams, J. V.; Tollefson, S. J.; Johnson, J. E. und Crowe, J. E. (2005): The cotton rat (*Sigmodon hispidus*) is a permissive small animal model of human metapneumovirus infection, pathogenesis, and protective immunity, Journal of Virology 79 [17], Seite 10944-10951.

[80] Murphy, T. F.; Dubovi, E. J. und Clyde, W. A. (1981): The Cotton Rat As An Experimental-Model of Human Para-Influenza Virus Type-3 Disease, Experimental Lung Research 2 [2], Seite 97-109.

[81] Ottolini, M. G.; Porter, D. D.; Hemming, V. G.; Hensen, S. A.; Sami, I. R. und Prince, G. A. (1996): Semi-permissive replication and functional aspects of the immune response in a

- cotton rat model of human parainfluenza virus type 3 infection, *Journal of General Virology* 77 [8], Seite 1739-1743.
- [82] Ottolini, M. G.; Porter, D. D.; Blanco, J. C. G. und Prince, G. A. (2002): A cotton rat model of human parainfluenza 3 laryngotracheitis: Virus growth, pathology, and therapy, *Journal of Infectious Diseases* 186 [12], Seite 1713-1717.
- [83] Porter, D. D.; Prince, G. A.; Hemming, V. G. und Porter, H. G. (1991): Pathogenesis of Human Parainfluenza Virus-3 Infection in 2 Species of Cotton Rats - *Sigmodon-Hispidus* Develops Bronchiolitis, While *Sigmodon Fulviventer* Develops Interstitial Pneumonia, *Journal of Virology* 65 [1], Seite 103-111.
- [84] Dye, C.; Watt, C. J.; Bleed, D. M.; Hosseini, S. M. und Raviglione, M. C. (2005): Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally, *Jama-Journal of the American Medical Association* 293 [22], Seite 2767-2775.
- [85] Maher, D. und Raviglione, M. (2005): Global epidemiology of tuberculosis, *Clinics in Chest Medicine* 26 [2], Seite 167-182.
- [86] Tortoli, E. (2006): The new mycobacteria: an update, *Fems Immunology and Medical Microbiology* 48 [2], Seite 159-178.
- [87] Hauer, B.; Rohde D. und Loddenkemper R. (2005): Tuberkulose, *Pneumologie* 2, Seite 291-306.
- [88] Mogues, T.; Goodrich, M. E.; Ryan, L.; LaCourse, R. und North, R. J. (2001): The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of Airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice, *Journal of Experimental Medicine* 193 [3], Seite 271-280.
- [89] Flynn, J. L. und Chan, J. (2001): Immunology of tuberculosis, *Annual Review of Immunology* 19, Seite 93-129.
- [90] North, R. J. und Jung, Y. J. (2004): Immunity to tuberculosis, *Annual Review of Immunology* 22, Seite 599-623.
- [91] Robert-Koch-Institut (2007): Epidemiologisches Bulletin 2007-11, *Epidemiologisches Bulletin* [11].
- [92] Corbett, E. L.; Watt, C. J.; Walker, N.; Maher, D.; Williams, B. G.; Raviglione, M. C. und Dye, C. (2003): The growing burden of tuberculosis - Global trends and interactions with the HIV epidemic, *Archives of Internal Medicine* 163 [9], Seite 1009-1021.
- [93] Smith, K. C und Starke, J. R. (1999): *Bacille Calmette-Guérin Vaccine*, Plotkin, S. A und Orenstein, W. A., *Vaccines*, Seite 111-139, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- [94] Colditz, G. A.; Brewer, T. F.; Berkey, C. S.; Wilson, M. E.; Burdick, E.; Fineberg, H. V. und Mosteller, F. (1994): Efficacy of Bcg Vaccine in the Prevention of Tuberculosis - Metaanalysis of the Published Literature, *Jama-Journal of the American Medical Association* 271 [9], Seite 698-702.
- [95] Andersen, P. und Doherty, T. M. (2005): The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine, *Nature Reviews Microbiology* 3 [8], Seite 656-662.
- [96] Mahairas, G. G.; Sabo, P. J.; Hickey, M. J.; Singh, D. C. und Stover, C. K. (1996): Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent M-*bovis*, *Journal of Bacteriology* 178 [5], Seite 1274-1282.
- [97] Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S. und Barrell, B. G. (1998): Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 [6685], Seite 537-544.

- [98] Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Camus, J. C.; Medina, N.; Mansoor, H.; Pryor, M.; Duthoy, S.; Grondin, S.; Lacroix, C.; Monsempe, C.; Simon, S.; Harris, B.; Atkin, R.; Doggett, J.; Mayes, R.; Keating, L.; Wheeler, P. R.; Parkhill, J.; Barrell, B. G.; Cole, S. T.; Gordon, S. V. und Hewinson, R. G. (2003): The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 [13], Seite 7877-7882.
- [99] Flint, J. L.; Kowalski, J. C.; Karnati, P. K. und Derbyshire, K. M. (2004): The RD1 virulence locus of *Mycobacterium tuberculosis* regulates DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 [34], Seite 12598-12603.
- [100] Brosch, R.; Gordon, S. V.; Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Frigui, W.; Valenti, P.; Dos Santos, S.; Duthoy, S.; Lacroix, C.; Garcia-Pelayo, C.; Inwald, J. K.; Golby, P.; Garcia, J. N.; Hewinson, R. G.; Behr, M. A.; Quail, M. A.; Churcher, C.; Barrell, B. G.; Parkhill, J. und Cole, S. T. (2007): Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 [13], Seite 5596-5601.
- [101] Gupta, R.; Espinal, M. A. und Raviglione, M. C. (2004): Tuberculosis as a major global health problem in the 21st century: A WHO perspective, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 25 [3], Seite 245-253.
- [102] Nunn, P.; Harries, A.; Godfrey-Faussett, P.; Gupta, R.; Maher, D. und Raviglione, M. (2002): The research agenda for improving health policy, systems performance, and service delivery for tuberculosis control: a WHO perspective, *Bulletin of the World Health Organization* 80 [6], Seite 471-476.
- [103] Gomes, M. G. M.; Franco, A. O.; Gomes, M. C. und Medley, G. F. (2004): The reinfection threshold promotes variability in tuberculosis epidemiology and vaccine efficacy, *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271 [1539], Seite 617-623.
- [104] Fletcher, H. und McShane, H. (2006): Tuberculosis vaccines: current status and future prospects, *Expert Opin. Emerg. Drugs* 11 [2], Seite 207-215.
- [105] Mwinga, A.; Nunn, A.; Ngwira, B.; Chintu, C.; Warndorff, D.; Fine, P.; Darbyshire, J. und Zumla, A. (2002): *Mycobacterium vaccae* (SRL172) immunotherapy as an adjunct to standard antituberculosis treatment in HIV-infected adults with pulmonary tuberculosis: a randomised placebo-controlled trial, *Lancet* 360 [9339], Seite 1050-1055.
- [106] Waddell, R. D.; Chintu, C.; Lein, A. D.; Zumla, A.; Karagas, M. R.; Baboo, K. S.; Habbema, J. D. F.; Tosteson, A. N. A.; Morin, P.; Tvaroha, S.; Arbeit, R. D.; Mwinga, A. und von Reyn, C. F. (2000): Safety and immunogenicity of a five-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae* vaccination for the prevention of HIV-associated tuberculosis, *Clinical Infectious Diseases* 30, Seite S309-S315.
- [107] Horwitz, M. A. und Harth, G. (2003): A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis, *Infection and Immunity* 71 [4], Seite 1672-1679.
- [108] Grode, L.; Seiler, P.; Baumann, S.; Hess, J.; Brinkmann, V.; Eddine, A. N.; Mann, P.; Goosmann, C.; Banderhann, S.; Smith, D.; Bancroft, G. J.; Reyrat, J. M.; van Soolingen, D.; Raupach, B. und Kaufmann, S. H. E. (2005): Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin, *Journal of Clinical Investigation* 115 [9], Seite 2472-2479.
- [109] Horwitz, M. A.; Harth, G.; Dillon, B. J. und Maslesa-Galic, S. (2000): Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 [25], Seite 13853-13858.
- [110] Skeiky, Y. A. W.; Alderson, M. R.; Ovendale, P. J.; Guderian, J. A.; Brandt, L.; Dillon, D. C.; Campos-Neto, A.; Lobet, Y.; Dalemans, W.; Orme, I. M. und Reed, S. G. (2004): Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a

- tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein, *Journal of Immunology* 172 [12], Seite 7618-7628.
- [111] Dietrich, J.; Aagaard, C.; Leah, R.; Olsen, A. W.; Stryhn, A.; Doherty, T. M. und Andersen, P. (2005): Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: Efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy, *Journal of Immunology* 174 [10], Seite 6332-6339.
- [112] Goonetilleke, N. P.; McShane, H.; Hannan, C. M.; Anderson, R. J.; Brookes, R. H. und Hill, A. V. S. (2003): Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara, *Journal of Immunology* 171 [3], Seite 1602-1609.
- [113] Williams, A.; Hatch, G. J.; Clark, S. O.; Gooch, K. E.; Hatch, K. A.; Hall, G. A.; Huygen, K.; Ottenhoff, T. H. M.; Franken, K. L. M. C.; Andersen, P.; Doherty, T. M.; Kaufmann, S. H. E.; Grode, L.; Seiler, P.; Martin, C.; Gicquel, B.; Cole, S. T.; Brodin, P.; Pym, A. S.; Dalemans, W.; Cohen, J.; Lobet, Y.; Goonetilleke, N.; McShane, H.; Hill, A.; Parish, T.; Smith, D.; Stoker, N. G.; Lowrie, D. B.; Kallenius, G.; Svenson, S.; Pawowski, A.; Blake, K. und Marsh, P. D. (2005): Evaluation of vaccines in the EU TB vaccine cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis, *Tuberculosis* 85 [1-2], Seite 29-38.
- [114] McShane, H.; Pathan, A. A.; Sander, C. R.; Keating, S. M.; Gilbert, S. C.; Huygen, K.; Fletcher, H. A. und Hill, A. V. S. (2004): Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans, *Nature Medicine* 10 [11], Seite 1240-1244.
- [115] Gupta, U. D. und Katoch, V. (2005): Animal models of tuberculosis, *Tuberculosis* 85 [5-6], Seite 277-293.
- [116] Department of Microbiology, Colorado State University:
www.cvmb.colostate.edu/microbiology/tb/top.htm, Rev. 06.05.2007
- [117] Kaufmann, S. H. E. (2003): Immune response to tuberculosis: experimental animal models, *Tuberculosis* 83 [1-3], Seite 107-111.
- [118] Vekemans, J.; Ota, M. O. C.; Sillah, J.; Fielding, K.; Alderson, M. R.; Skeiky, Y. A. W.; Dalemans, W.; Mcadam, K. P. W. J.; Lienhardt, C. und Marchant, A. (2004): Immune responses to mycobacterial antigens in the Gambian population: Implications for vaccines and immunodiagnostic test design, *Infection and Immunity* 72 [1], Seite 381-388.
- [119] Kremer, L.; Maughan, W. N.; Wilson, R. A.; Dover, L. G. und Besra, G. S. (2002): The M-tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity, *Letters in Applied Microbiology* 34 [4], Seite 233-237.
- [120] Shams, H.; Klucar, P.; Ewer, S. E.; Lalvani, A.; Moonan, P. K.; Safi, H.; Wizel, B.; Ewer, K.; Nepom, G. T.; Lewinsohn, D. M.; Andersen, P. und Barnes, P. F. (2004): Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4(+) and CD8(+) T cells in the context of multiple HLA alleles, *Journal of Immunology* 173 [3], Seite 1966-1977.
- [121] van Pinxteren, L. A. H.; Ravn, P.; Agger, E. M.; Pollock, J. und Andersen, P. (2000): Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 [2], Seite 155-160.
- [122] Sherman, D. R.; Voskuil, M.; Schnappinger, D.; Liao, R. L.; Harrell, M. I. und Schoolnik, G. K. (2001): Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 [13], Seite 7534-7539.
- [123] Roupie, V.; Romano, M.; Zhang, L.; Korf, H.; Lin, M. Y.; Franken, K. L. M. C.; Ottenhoff, T. H. M.; Klein, M. R. und Huygen, K. (2007): Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice, *Infection and Immunity* 75 [2], Seite 941-949.
- [124] Coler, R. N.; Skeiky, Y. A. W.; Ovendale, P. J.; Vedvick, T. S.; Gervassi, L.; Guderian, J.; Jen, S.; Reed, S. G. und Campos-Neto, A. (2000): Cloning of a *Mycobacterium tuberculosis*

- gene encoding a purified protein derivative protein that elicits strong tuberculosis-specific delayed-type hypersensitivity, *Journal of Infectious Diseases* 182 [1], Seite 224-233.
- [125] Coler, R. N.; Campos-Neto, A.; Ovendale, P.; Day, F. H.; Fling, S. P.; Zhu, L. Q.; Serbina, N.; Flynn, J. L.; Reed, S. G. und Alderson, M. R. (2001): Vaccination with the T cell antigen Mtb 8.4 protects against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Immunology* 166 [10], Seite 6227-6235.
- [126] Mollenkopf, H. J.; Grode, L.; Mattow, J.; Stein, M.; Mann, P.; Knapp, B.; Ulmer, J. und Kaufmann, S. H. E. (2004): Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: Improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis, *Infection and Immunity* 72 [11], Seite 6471-6479.
- [127] Sambrook, J. und Russell D.W. (2001): *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [128] Mühlhardt, C. (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
- [129] Skiadopoulos, M. H.; Surman, S. R.; Riggs, J. M.; Orvell, C.; Collins, P. L. und Murphy, B. R. (2002): Evaluation of the replication and immunogenicity of recombinant human parainfluenza virus type 3 vectors expressing up to three foreign glycoproteins, *Virology* 297 [1], Seite 136-152.
- [130] Qimron, U.; Paul, L.; Bar-Haim, E.; Bloushtain, N.; Eisenbach, L.; Staats, H. F. und Porgador, A. (2004): Non-replicating mucosal and systemic vaccines: quantitative and qualitative differences in the Ag-specific CD8(+) T cell population in different tissues, *Vaccine* 22 [11-12], Seite 1390-1394.
- [131] Saunders, L. R. und Barber, G. N. (2003): The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions, *Faseb Journal* 17 [9], Seite 961-983.
- [132] Taylor, D. R.; Puig, M.; Darnell, M. E. R.; Mihalik, K. und Feinstone, S. M. (2005): New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1, *Journal of Virology* 79 [10], Seite 6291-6298.
- [133] Stout, C.; Murphy, M. D.; Lawrence, S. und Julian, S. (1989): Evaluation of A Monoclonal-Antibody Pool for Rapid Diagnosis of Respiratory Viral-Infections, *Journal of Clinical Microbiology* 27 [3], Seite 448-452.
- [134] Diaz, M. O.; Ziemien, S.; Lebeau, M. M.; Pitha, P.; Smith, S. D.; Chilcote, R. R. und Rowley, J. D. (1988): Homozygous Deletion of the Alpha-Interferon and Beta-1-Interferon Genes in Human-Leukemia and Derived Cell-Lines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 [14], Seite 5259-5263.
- [135] Andrejeva, J.; Childs, K. S.; Young, D. F.; Carlos, T. S.; Stock, N.; Goodbourn, S. und Randall, R. E. (2004): The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 [49], Seite 17264-17269.
- [136] Komatsu, T.; Takeuchi, K. und Gotoh, B. (2007): Bovine parainfluenza virus type 3 accessory proteins that suppress beta interferon production, *Microbes and infection* 9 [8], Seite 954-962.
- [137] Komatsu, T.; Takeuchi, K.; Yokoo, J. und Gotoh, B. (2004): C and V proteins of Sendai virus target signaling pathways leading to IRF-3 activation for the negative regulation of interferon-beta production, *Virology* 325 [1], Seite 137-148.
- [138] Miyata, H.; Kanazawa, T.; Shibuya, K. und Hino, S. (2005): Contamination of a specific-pathogen-free rat breeding colony with Human parainfluenza virus type 3, *Journal of General Virology* 86, Seite 733-741.
- [139] Lozes, E.; Huygen, K.; Content, J.; Denis, O.; Montgomery, D. L.; Yawman, A. M.; Vandenbussche, P.; Van Vooren, J. P.; Drowart, A.; Ulmer, J. B. und Liu, M. A. (1997): Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex, *Vaccine* 15 [8], Seite 830-833.

- [140] Bendelja, K.; Gagro, A.; Bace, A.; Lokar-Kolbas, R.; Krsulovic-Hresic, V.; Drazenovic, V.; Mlinaric-Galinovic, G. und Rabatic, S. (2000): Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry, *Clinical and Experimental Immunology* 121 [2], Seite 332-338.
- [141] Govindarajan, D.; Buchholz, U. J. und Samal, S. K. (2006): Recovery of avian metapneumovirus subgroup C from cDNA: Cross-recognition of avian and human metapneumovirus support proteins, *Journal of Virology* 80 [12], Seite 5790-5797.
- [142] Zhang, L. Q.; Bukreyev, A.; Thompson, C. I.; Watson, B.; Peeples, M. E.; Collins, P. L. und Pickles, R. J. (2005): Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium, *Journal of Virology* 79 [2], Seite 1113-1124.
- [143] Dominguez, J.; Lorenzo, M. D. und Blasco, R. (1998): Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry, *Journal of Immunological Methods* 220 [1-2], Seite 115-121.
- [144] Yoneda, M.; Guillaume, V.; Ikeda, F.; Sakuma, Y.; Sato, H.; Wild, T. F. und Kai, C. K. (2006): Establishment of a Nipah virus rescue system, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 [44], Seite 16508-16513.
- [145] Sieg, S.; Murocacho, C.; Robertson, S.; Huang, Y. und Kaplan, D. (1994): Infection and Immunoregulation of T-Lymphocytes by Parainfluenza Virus Type-3, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 [14], Seite 6293-6297.
- [146] Plotnicky-Gilquin, H.; Cyblat, D.; Aubry, J. P.; Delneste, Y.; Blaecke, A.; Bonnefoy, J. Y.; Corvaia, N. und Jeannin, P. (2001): Differential effects of parainfluenza virus type 3 on human monocytes and dendritic cells, *Virology* 285 [1], Seite 82-90.
- [147] Basaraba, R. J.; Brown, P. R.; Laegreid, W. W.; Silflow, R. M.; Evermann, J. F. und Leid, R. W. (1993): Suppression of Lymphocyte-Proliferation by Parainfluenza Virus Type-3-Infected Bovine Alveolar Macrophages, *Immunology* 79 [2], Seite 179-188.
- [148] Stallwood, Y.; Fisher, K. D.; Gallimore, P. H. und Mautner, V. (2000): Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients, *Gene Therapy* 7 [8], Seite 637-643.
- [149] Biacchesi, S.; Skiadopoulos, M. H.; Yang, L. J.; Murphy, B. R.; Collins, P. L. und Buchholz, U. J. (2005): Rapid human metapneumovirus microneutralization assay based on green fluorescent protein expression, *Journal of Virological Methods* 128 [1-2], Seite 192-197.
- [150] Fujino, M.; Yoshida, N.; Kimura, K.; Zhou, J. H.; Motegi, Y.; Komase, K. und Nakayama, T. (2007): Development of a new neutralization test for measles virus, *Journal of Virological Methods* 142 [1-2], Seite 15-20.

Anhang

Tabelle A.1: Sequenzierprimer für Vektoren

Die folgenden 87 Primer fanden Verwendung für die Sequenzierung der im reversen Genetiksystm eingesetzten Plasmide. pTM-Primer und pbh-Primer lagern sich an das jeweilige Vektorrückgrad an und werden auf die Insertionsstelle zu elongiert. Deshalb können sie zur Überprüfung der Insertion weiterer Geneinheiten wie auch zu deren Sequenzierung eingesetzt werden. Die Gen-spezifischen Primer sind mit der Position im Vektor bezeichnet, wobei sich diese für das N, P, und L Gen auf die Positon im pTM-Vektor und für die der anderen Gene auf die Position im pbhPIV3 beziehen.

pTM-rew	ttgctcagcgggtggcag
pTM-forw	cacatgctttacatgtgttagtcgagg
pbh-r 15580	tgcgcgtatatagttcctccttcag
pbh-f 18470	gtacgcttcgcacctcga
N-forw 1450	gtgagtctattcgacacattcagtc
N-rew 1610	gctctttgcgcagctgc
N-forw 1835	ggatgttcgggagtgatcttgagt
N-rew 2040	caccgctcaacactagactgg
N-forw 2215	aggaaactacatcagagatgcaggtc
N-rew 2415	ctacacccatcgcataactccag
N-forw 2655	cagcagttcagatacaaccttcataagc
N-rew 2850	ctcgttgagcttttgttcagcctg
N-forw 2965	gattgttcagtcattcggaagc
P-forw 1700	ggcatcacacgaacgtgc
P-forw 2060	gccgcaacactagatgacg
p-forw 2480	aggacacagaagagagcactcg
P-forw 2860	acctagcgggaggacatcc
P-forw 3210	catgttcaatgaggatgtcagctcc
P-rew 2900	gtgtttccataagagggtaaactg
P-rew 2545	cacacaactctctgtcttggtataggtc
P-rew 2190	cgatcctttgaagttgagtcgtagtcc
P-rew 1810	gttaggatctgggctgctctg
P-rew 1455	cctgatccctcttccaagaatcc
M-rew 3725	ggtgatgctcattgttcggagg
M-forw 3900	cccaaacatggatccagatatctgg
M-rew 3975	cagagccacaaaccttgtaacttg
M-forw 4280	tgatattgtgaactgcacagcaattgg
M-rew 4370	actcctttggaatctgtctgaactcc
M-forw 4665	ctgctatcccctaattgatctgaatcc
M-rew 4730	tgggtagtatctgaattgccagg
F-forw 5080	gccaaactcaatactgctaattattacaacc
F-rew 5130	ggactgttgaccaatacacctacg
F-forw 5480	agcaggcaagatcagacatcg

F-rew 5515	gctctgaactgactgcactgc
F-forw 5880	tgacttgaatgattactcaatcacctcc
F-rew 5910	actttgtagatctgagtggtcagcagc
F-forw 6275	gaatcaatcaaccacctgatcaaggag
F-rew 6310	tgtattgaacagcattccgttgatacc
F-forw 6525	tggaattggcatcaatctagcactac
F-rew 6625	atggcttgatctttgatccactcg
H-forw 6860	tgctactcatggcaacaagc
H-rew 6960	cagcaatgattcgtgggcc
H-forw 7270	gagatgcacgtctggtcttcc
H-rew 7330	acagccatcaacagtcgttgg
H-forw 7560	aggaagtcattgtctctagcactcc
H-rew 7540	aggagtgcctagagaacatgactcc
H-forw 7845	ctgcaacacaactgggtgc
H-rew 7920	agcctttgtcaacaacaatgatggag
H-forw 8155	gacatggcataatgtgctatcaagacc
H-rew 8230	ctccctgtgggattgagtgg
H-forw 8385	cagctggatatacaacaacaagctgc
L-forw 1555	gcctcagccctacgatatgg
L-forw 1950	tcagacaaatggtataatccattcaagacatggt
L-forw 2350	gacccgggttaaacagctcagg
L-forw 2680	gtgggtcaatggcctccag
L-forw 3120	tgacatacaagatgagggctacacaag
L-forw 3530	tgaccctcgccttgaaaag
L-forw 3960	ggatatactatgacggaagaatccttctc
L-forw 4355	agcaaattgttagatcgagggtcc
L-forw 4705	cgagtagggataagcagaggagg
L-forw 5100	tcagttacagatgagagatctgaagcac
L-forw 5505	aggttagaggagagtacaggacataacc
L-forw 5900	gtttctcaaaacatttgagggttactcg
L-forw 6260	agacaagcatttctctcaagacatcttgc
L-forw 6710	gcttcgaatgttactacacatggaatgac
L-forw 7155	gacatggaggaggcgatagg
L-forw 7570	gaggccatatcatcacgactgc
L-forw 7905	cagaccggatatgtatcattggctg
L-rew 8020	gaattcctagtagtttgactcctcctataagc
L-rew 7685	tgtcatgagtgatattgacccattcgaac
L-rew 7305	agggacactacactfacatccttcc
L-rew 6895	caggaccgaggttagcatcataac
L-rew 6515	ggatcccaatcttcaatcgtttcag

L-rew 6275	tggtccaaaagatgctatctctgc
L-rew 5890	gcaaattgattcacgagtaaccctcc
L-rew 5490	gatgcatgaccataggggttatgtcc
L-rew 5070	gcttcagatctctcatctgtaactgatcc
L-rew 4680	cctcctctgcttatccctactcg
L-rew 4290	gctaacgcagcgactgtagg
L-rew 3940	cctgaggaaggattcttccgtc
L-rew 3545	gcgggcaataaggatctcc
L-rew 3165	ctcctttaaccatcccattctcttg
L-rew 2790	tcttcatccaattgaggctctataaactgtc
L-rew 2395	cctctgtgtacactcagctgc
L-rew 2115	acatcacaatacattagtagccaattcaggagtca
L-rew 1695	ttggaacatttcactagacatctctgg
L-rew 1425	gctgtgggactcgggtgc

Tabelle A.2: Klonierungsprimer

Die folgenden 12 Primer fanden Verwendung für die Klonierung der mykobakteriellen Antigene von genomischer DNA bzw. des EGFP-ORFs vom Plasmid pEGFP-N1 (siehe auch Abbildung 5.3)

cl-Rv3407-f	tga tct cct gca gga tgc gtg cta ccg ttg ggc
cl-Rv3407-r	cga tat cct gca gga tag atc act gct cgt cgc gca
cl-HspX-f	aga cct gca gga tgg cca cca ccc ttc ccg ttc
cl-HspX-r	tct cct gca ggg gtc agt tgg tgg acc gga tct g
cl-Mtb8.4-f	gag cct gca gga tga ggc tgt cgt
cl-Mtb8.4-r	ctc cct gca ggg ctt aat agt tgt tgc agg agc cgg caa ccg ac
cl-cfp10-f	gag aaa gta gct tag cat ggc aga gat g
cl-cfp10-r	aaa agc taa gcg cta gct tct tta atc cta agt ttt tct tac ttg cgg gtc aga agc cca ttt gcg agg
cl-AG85A-f	gag gat gag ctt agc aag aat gca gct tgt tga cag g
cl-AG85A-r	aaa agc taa gcg cta gct tct tta atc cta agt ttt tct tac ttg cta ggc gcc ctg ggg cgc ggg cac g
cl-EGFP-f	gac gct tag cct gca gga tgg tga gca agg gcg agg agc tgt tc
cl-EGFP-r	ctc gct aag cgc tag ctt ctt taa tcc taa gtt ttt ctt act tcc tgc agg ccg ctt tac ttg tac agc tcg tcc atg ccg ag

Tabelle A.3: Sequenzierprimer für Subklone und mRNAs

Die folgenden 20 Primer wurden verwendet um die pGEM-T-basierten Subklone und die mit Hilfe von oligo-dT-Primern in cDNA umgeschriebenen viralen mRNAs zu sequenzieren

T7	taa tac gac tca cta tag gg
SP6	tat tta ggt gac act ata g
cDNA-f	agg taa ggg gaa aga aat cct aag agc
cDNA-r	ttt ttt ttt ttt ttt ttt tct tac
Cfp10-10f	gca gag atg aag acc gat gc
Cfp10-300r	tca gaa gcc cat ttg cga gg
Mtb8.4-10f	gtc gtt gac cgc att gag cg
Mtb8.4-300r	caa ggc cga tgt act gtg cc
HspX-10f	cac cct tcc cgt tca gcg
HspX-430r	gtg gac cgg atc tga atg tgc t
EGFP-40f	ggc gag gag ctg ttc acc
EGFP-370f	tga agt tcg agg gcg aca cc
EGFP-400r	ggt gcc gtc ctc ctt gaa gtc g
EGFP-720r	gca ggc cgc ttt act tgt aca g
AG85A-200f	gcc gtg aca tca agg tcc
AG85A-500f	cgg tct ttc gat ggc tgc
AG85A-800f	gat ctg ggt ggc aac aac c
AG85A-900r	cca gta ctc cca gct gtg c
AG85A-650r	cac atg tcg gag gcc ttg tag c
AG85A-350r	gtc gga gta gaa gct tga ctg g

Veröffentlichung

Schomacker H, Collins PL, Schmidt AC

In silico identification of a putative new paramyxovirus related to the Henipavirus genus

Virology, 2004, 330 (1), 178-185

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Detlev Krüger bin ich großem Dank verpflichtet, für seine Bereitschaft diese Arbeit in der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu vertreten.

Prof. Dr. Alexander Schmidt sei gedankt für die freundliche Überlassung des Themas und seine nimmermüde Unterstützung. Dr. Michael Burwinkel bin ich sehr dankbar für die Betreuung im Labor und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Fadi Chaabo danke ich für die überaus kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit, ebenso Rita Strozynski, Loreen Kirchhof und Ruth Herrmann, die mich großartig bei den Laborarbeiten unterstützten.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Gruppe Prof. Dr. Stefan Kaufmann am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin. Insbesondere Christiane Desel und Dr. Sven Baumann tragen großen Anteil an der Durchführung und am Gelingen des in Kooperation durchgeführten Infektions-Versuches.

Große Hilfe erhielt ich außerdem von Dr. Christian Meisel und Claudia Sievers aus der Klinik für Immunologie und von Sven Guhl aus der Klinik für Dermatologie, ohne die ich weder am FACS noch am Fluorometer Ergebnisse erhalten hätte. Ich danke Ramona Scheufele aus dem Institut für Biometrie für die statistische Beratung.

Linda Ebermann und Stefan Kernstock haben sich sehr bemüht, diese Arbeit zu verbessern und lesbarer zu gestalten. Beiden danke ich herzlich für ihre immer offenen Ohren und ihre großzügige Nachsicht mit meinen Unzulänglichkeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie, die mir immer jene Unterstützung und jenen Rückhalt gewährte, ohne die ich diese Arbeit nur schwer hätte zu Ende führen können.

Erklärung

Entsprechend der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I erkläre ich hiermit, dass

- mir die Promotionsordnung bekannt ist,
- ich mich an keinem anderen Ort um einen Doktorgrad beworben habe,
- ich keinen Doktorgrad besitze,
- ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, im Oktober 2007

Henrick Schomacker